

Über Manganfixierung durch
Mikroorganismen sowie das Verhalten von
Bacillus subtilis in manganreichen
Medien

Adolf Bauernfeind

Über Manganfixierung durch Mikroorganismen sowie
das Verhalten von *Bacillus subtilis*
in manganreichen Medien.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu
München

vorgelegt von
Adolf Bauernfeind
aus

Röslau/Ofr.

Dezember 1959



5349/60

1. Referent: Prof. Dr. F. B u k a t s c h

2. Referent: Prof. Dr. L. B r a u n e r

Tag der mündlichen Prüfung: 27.1.1959 1960

INHALT.

Seite

A. Bisherige Arbeiten über Beziehungen zwischen Mangan und höheren Pflanzen sowie Mikroorganismen	
I. Die Bedeutung des Mangans für höhere Pflanzen	1
II. Beziehungen zwischen Mangan und Mikroorganismen	2
B. Über Manganfixierung durch Mikroorganismen sowie das Verhalten von <i>Bacillus subtilis</i> in manganreichen Medien	
I. Manganaufnahme verschiedener Mikroorganismen	8
1. <i>Bacillus subtilis</i>	10
2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	13
3. <i>Bacillus mycoides</i>	16
4. <i>Azotobacter chroococcum</i>	16
5. Streptomyceten	18
II. Die Art der Manganfixierung durch <i>Bacillus subtilis</i>	19
1. Extrahierbarkeit des aufgenommenen Mangans mit verschiedenen Lösungsmitteln	19
2. Manganaufnahme und Sporulation	24
III. Physiologische Wirkungen des Mangans bei <i>Bacillus subtilis</i>	28
Einfluß von Mangangaben auf die	
1. Eiweißsynthese, Farbstoffbildung und Reaktionsverschiebung	29
2. Dauer der Latenzphase des Wachstums	34
3. Katalaseaktivität	37
Diskussion	40

IV. Verhalten bakterieller Rhizosphärenorganismen von <i>Avena sativa</i> gegenüber Mangan	42
V. Systematische Einordnung der manganfixierenden Stämme aus dem Wurzelbereich des Hafers	45
1. Methodik	45
2. Ergebnisse der Bestimmung	48
C. Diskussion	57
D. Zusammenfassung	60
E. Literatur	62

ÜBER MANGANFIXIERUNG DURCH MIKROORGANISMEN SOWIE

DAS VERHALTEN VON BACILLUS SUBTILIS

IN MANGANREICHEN MEDIEN

A. BISHERIGE ARBEITEN ÜBER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN MANGAN UND HÖHEREN PFLANZEN SOWIE MIKROORGANISMEN.

I. Die Bedeutung des Mangans für höhere Pflanzen.

Nachdem Carl Wilhelm SCHEELE bereits 1774 gezeigt hatte, daß höhere Pflanzen Mangan aus dem Boden aufnehmen, wies eine Reihe von Autoren (McHARGUE 1922 (1), GILBERT und McLEAN 1913 (2), CLARK und FLY 1930 (3)) auf die Notwendigkeit des Mangans für Wachstum und Ertrag grüner Pflanzen hin.

Mangangaben von 0.4 - 2.0 mg $MnCl_2$ pro Liter Nährlösung führten nach BUKATSCH (4, 1942) zu einer beträchtlichen Steigerung von Blattgrünbildung und Photosyntheseleistung bei Gerste und Weizen.

Bei Untersuchungen über die Bedeutung des Mangans für die Photosynthese fand GERRETSEN (5) 1950 in rohen Chloroplast-suspensionen von *Avena sativa* nach Beleuchtung deutliche Unterschiede der Redoxpotentiale gesunder und manganmangelkranker Pflanzen. Zusätze von 0.2 mg Mn / 8ml Suspension hoben das Potential bei letzteren auf das Niveau der gesunden. Ferner war die CO_2 -Assimilation manganmangelkranker Pflanzen wesentlich geringer als die gesunder. Auf Grund dieser Beobachtungen schließt GERRETSEN auf eine wichtige Rolle des Mangans innerhalb eines photosensitiven Oxydations-Reduktionssystems, wobei ein Gleichgewicht zwischen Mn^{++} und Mn^{+++} bestehen soll, das bei Beleuchtung in Richtung zum Mn^{+++} hin verschoben werde.

Aus den erwähnten Arbeiten geht die Notwendigkeit des Mangans für das Gedeihen höherer Pflanzen hervor.

Kann ihr Manganbedarf nicht ausreichend gedeckt werden, so kommt es zu Wachstums- und Ertragsrückgängen sowie dem Auftreten der Symptome der "grey speck disease", die zuerst von SAMUEL und PIPER 1928 (6) in direkten Zusammenhang mit Manganmangel gebracht wurden. Dabei werden - nach GERRETSEN (7) - die Blätter chlorotisch, bekommen graugrüne Flecken, die schließlich austrocknen und gelbbraun werden.

II. Beziehungen zwischen Mangan und Mikroorganismen

Schon zu Anfang des Jahrhunderts war man - zuerst in den landwirtschaftlich intensiv genutzten Gebieten Hollands - auf das rasche Nachlassen der Wirkung von Mangandüngung aufmerksam geworden. Man brachte diese Erscheinung in Zusammenhang mit der Tätigkeit von Mikroorganismen und vermutete, daß zugesetztes Mangan von den Bakterien in eine den Wurzeln höherer Pflanzen nicht zugängliche Form überführt werde.

So hatte BEIJERINCK (8) bereits 1913 von einem aus Gartenerde isolierten, weit verbreiteten Organismus berichtet, der imstande war, Mangancarbonat in höhere Manganoxyde umzuwandeln. Er bezeichnete ihn als "*Bacillus manganicus*" und gab folgende Beschreibung:

"Bodenbakterium, wächst auf Platten von reinem Agar mit Salzen und bedeckt mit einer anklebenden Schicht von Mangancarbonat, welches oxydiert wird. Das Bakterium erzeugt braune und schwarze Flecken von 0.5 - 1 cm Mittellinie, worin entweder lose Mikrokokken oder kleine, feste, in Manganioxyd eingekapselte Körnchen oder Knöpfchen, welche aus sehr kleinen, stark beweglichen Stäbchen von 0.2 μ Dicke bei 1.5 - 2 μ Länge bestehen, enthalten sind.

Auf Agarplatten mit 0.05% Manganlaktat schwieriges Wachstum zu kleinen, braunen Kolonien von beweglichen Bazillen wie oben."

Organische Substanzen wurden in nur sehr geringen Konzentrationen vertragen; trotzdem war Mangancarbonat als Kohlenstoff- und Energiequelle nicht geeignet (Agar + MnCO_3 : kein Wachstum). Dasselbe gilt auch für eine Reihe von Pilzen, so für *Papulospora manganica* sowie für Vertreter der Gattungen *Botrytis*, *Mycocone*, *Trichocladium* und *Sporocybe*, die nach BEIJERINCK Mangancarbonat in Braunsteinferrite umwandeln, welche in einiger Entfernung vom Mycel als braune Körper auftreten, woraus der Verfasser auf die Ausscheidung von Oxydasen (bei "*Bacillus manganicus*" war die Manganoxydierung an den Bakterienkörper gebunden : Endoxydase), schließt.

SÖHNGEN (9) berichtet 1914 über Bildung höherer Manganoxysäuren aus Mangansalzen von Oxydsäuren durch eine Reihe von Mikroorganismen.

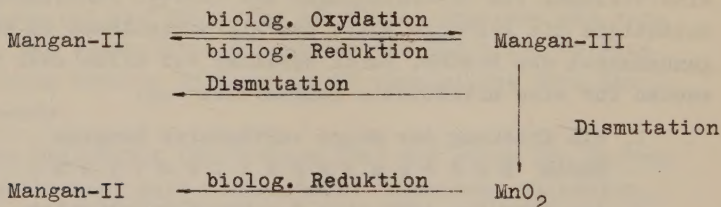
Eine Vielzahl von Untersuchungen der letzten Jahrzehnte bestätigte die wichtige Rolle der Mikroorganismen im Manganhaushalt des Bodens. Dabei sprechen vor allem zwei Tatsachen für eine mikrobielle Manganfixierung:

1. die Erhöhung der Menge verfügbaren Mangans durch Bodensterilisation,
2. das gehäufte Auftreten der Mangelkrankheiten innerhalb eines bestimmten - für Bakterienwachstum optimalen - pH-Bereichs.

TIMONIN (10) fand 1946 in der Rhizosphäre einer manganmangelempfindlichen Hafersorte eine im Vergleich zu einer resistenten Sorte wesentlich dichtere Population "manganoxydierender, kaseinhydrolysierender und denitrifizierender Bakterien". Durch Bodensterilisation mit Cyangas sowie Formalin konnte die Krankheit unter Kontrolle gebracht und der Ertrag gesteigert werden.

TROCME und BARBIER (11) stellten in dem von ihnen untersuchten Boden eine rasche Umwandlung zugegebenen löslichen Mangans in eine nicht austauschbare Form (mit 1-n Na-azetat sowie -zitratlösung nicht mehr extrahierbar) fest. Sie vermuteten biologische Oxydation und gaben als Oxydationsinhibitoren Azide sowie Toluol zu den untersuchten Böden; dabei verblieben 70% des zugeführten Mangans in austauschbarer Form. MANN und QUASTEL (12) ließen durch alkalische und neutrale Böden über 7 Tage eine Mangansulfatlösung laufen und überprüften täglich deren Mangangehalt sowie die Menge höherer Oxyde im Boden. Dabei ergab sich eine ständige Abnahme des Mangan-II der Lösung, andererseits nahm der Anteil höherer Manganoxyde des Bodens laufend zu. Versetzten sie die Mangansulfatlösung mit biologischen Giften, so nahm die Festlegung des Mangans stark ab oder kam völlig zum Stillstand.

Auf Grund ihrer Untersuchungen gaben MANN und QUASTEL ein Schema des "Manganese Metabolism in Soils":



Auch DION (13) hielt das vorübergehende Auftreten dreiwertigen Mangans (in Form von $\text{Mn}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) als Folge biologischer Oxydation für wahrscheinlich. Die anschließende Dismutation des Mn-III in Mn-II und Mn-IV wurde als pH-abhängig befunden; sie verlief bei pH 6.2 wesentlich rascher als bei pH 7.5. - Dies führt zur Frage des Zusammenhangs zwischen pH und Mangansfestlegung:

FUJIMOTO (14) konnte bei Chlorosen infolge Mn-Überschuß Besserung nach Erhöhung des pH durch Kalkung mit Dolomit erzielen.

OLSEN (15) u.a. fanden eine größere Beständigkeit des Mangans in saurem Milieu.

COIX und COPPENET (16) stellten nach Kalkung humoser, saurer Böden der Bretagne auf pH 6.4 - 6.6 Halbierung der Menge austauschbaren Mangans und Auftreten von Manganmangelsymptomen bei Kulturpflanzen fest.

LUNDEGARDH (17) fand den Mangangehalt von Haferblättern im Minimum zwischen pH 6.5 und 7.5; innerhalb desselben pH-Intervalls hatte er Chlorosen am häufigsten beobachtet. Er schließt jedoch die Möglichkeit rein chemischer Manganaußfällung nicht aus. Andererseits zeigen die Experimente GERRETSENS (7) - er fand in in-vitro-Versuchen die bakterielle Manganabscheidung auf den pH-Bereich zwischen 6.5 und 7.8 mit einem Maximum um 7.0 beschränkt - daß die H-Ionen-Konzentration auch auf biologischem Wege (durch Begünstigung des Mikrobenwachstums) wesentlich die Verfügbarkeit des Mangans im Boden beeinflußt.

Neben der Wasserstoffionenkonzentration ist für die Austauschbarkeit des Mangans eine Reihe weiterer Faktoren von Bedeutung; so das im Verlauf des Jahres sich ständig verändernde Redoxpotential des Bodens (schwankender Wassergehalt, verschiedene Mengen organischer Substanz), das Vorhandensein von Komplexbildnern (z.B. sind einige von Eubacteriales - NEWTON (18) - sowie Actinomycetales - ALBERT (19) - ausgeschiedene Antibiotika wie Polymyxin, Aureomycin und Terramycin in der Lage mit Mangan-II-Ionen relativ stabile Komplexe zu formieren) sowie allgemein das Ionengleichgewicht.

Daraus geht der komplexe Charakter des Problems der Manganfizierung hervor. Erst aus dem Zusammenwirken einer Reihe von Faktoren resultiert die Verfügbarkeit des Mangans; einen besonders wirkungsvollen Faktor dürften dabei die mikrobiologischen Verhältnisse des betreffenden Bodens darstellen. Ausgangspunkt unserer Untersuchungen über

die Rolle von Bakterien bei der Manganfestlegung war eine Reihe von Versuchen GERRETSENS aus dem Jahre 1937, deren Ergebnisse im folgenden kurz zusammengefaßt sind:

GERRETSEN fand (seine Angaben wurden von TIMONIN (10) bestätigt) in der Rhizosphäre manganmangelkranker Pflanzen eine wesentlich dichtere Bakterienpopulation als in derjenigen gesunder. Ferner konnte er zeigen, daß bei Kulturen gleicher Mangangaben (*Avena sativa*) - einmal infiziert mit von Wurzelspitzen mangelkranker Pflanzen isolierten Bakterien und einmal unter sterilen Bedingungen gezogen - lediglich in den infizierten Kulturen typische Manganmangelsymptome auftraten; das Trockengewicht der in sterilem Milieu gewachsenen Pflanzen war nach vier Wochen doppelt so groß wie das der infizierten.

Weiterhin fand GERRETSEN, daß Bakterien auch durch unmittelbare Schädigung des Wurzelsystems zum Auftreten von Chlorosen beitragen: die Wurzeln manganmangelkranker Haferpflanzen wurden braun, glasig und starben u.U. völlig ab. Bei reichlicher Manganversorgung und gleichzeitiger Infektion jedoch blieben die Wurzeln gesund. Die in sterilen Kulturen (mit Mangan) ausgebildeten langen Wurzelhaare verschwanden bei Infektionen.

Somit stehen nach GERRETSEN Mikroorganismen zur Manganversorgung höherer Pflanzen in zweierlei Beziehungen:

1. sie überführen lösliches Mangan in eine nicht austauschbare Form,
2. parasitäre Mikroorganismen schädigen das Wurzelsystem der infolge Manganmangel anfällig gewordenen höheren Pflanzen.

Schließlich konnte GERRETSEN von Wurzelspitzen mangelkranker Pflanzen Bakterien isolieren und "some 30 strains" in Reinkultur züchten. Diese Mikroorganismen waren in der Lage, die Wurzeln in Abwesenheit von Mangan anzugreifen. Leider fehlt eine genaue mikrobiologische Charakterisie-

rung dieser Bakterienstämme (am häufigsten Bact. fluor. liq. "as well other putrefying bacteria").

BROMFIELD (20) führte GERRETSEns Untersuchungen weiter und fand, daß die von diesem isolierten Bakterien nicht in der Lage waren, Mangan zu oxydieren. Er konnte jedoch Manganoxydation in einem Zitratmedium in Gegenwart von Oxysäuren beobachten in Mischkulturen von einem *Corynebacterium* mit einer pigmentierten Art der Gattungen *Chromobacterium* oder *Flavobacterium*. Bei Pilzen waren Vertreter der Gattungen *Cladosporium*, *Triragsche-mia* sowie *Pleospora* imstande Mangan zu oxydieren.

Zusammenfassend läßt sich feststellen:

Zahlreiche Autoren haben auf die Bedeutung der Mikroorganismen bei der Manganversorgung höherer Pflanzen hingewiesen. In den - häufig von unmittelbar praktischen Gesichtspunkten geleiteten Arbeiten - fehlen jedoch (mit Ausnahme des von BEIJERINCK beschriebenen "*Bacillus manganicus*", sowie in den Darstellungen BROMFIELDs) genauere Angaben über die für die Manganfixierung verantwortlichen Bakterienarten sowie quantitative Untersuchungen ihres Verhaltens gegenüber Mangan.

Auf Grund dieser Tatsachen schien es von Interesse, eine Reihe von Bakterienarten hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber Maganionen zu untersuchen; zunächst, ob sie in der Lage sind, die Konzentration des in der Nährlösung vorhandenen Mangans wesentlich zu verändern.

B. ÜBER MANGANFIXIERUNG DURCH MIKROORGANISMEN SOWIE
DAS VERHALTEN VON BACILLUS SUBTILIS IN
MANGANREICHEN MEDIEN.

I. Manganaufnahme verschiedener Mikroorganismen.

Bei folgenden Bakterienstämmen wurde die Manganaufnahme aus flüssigem Nährmedium untersucht:

B a c i l l u s s u b t i l i s ,
P s e u d o m o n a s f l u o r e s c e n s ,
B a c i l l u s m y c o i d e s ,
A z o t o b a c t e r c h r o o c o c c u m ,
S t r e p t o m y c e t e n (5 Stämme).

Methodik.

Als Kulturgefäße fanden in allen Fällen mehrfach sorgfältig mit heißer Chromschwefelsäure, heißem Wasser und aqua dest. gereinigte 200 ml Erlenmeyerkolben Verwendung, wobei darauf geachtet wurde, daß für die verschiedenen Mangankonzentrationen immer dieselben Kolben benutzt wurden, was besonders bei O-Kontrollen und geringen Manganangaben von Vorteil ist. B a c i l l u s s u b t i l i s , P s e u d o m o n a s f l u o r e s c e n s sowie B a c i l l u s m y c o i d e s wurden auf MERCKs Standard-II-Nährbouillon gezogen, deren Mangangehalt als ausreichend gering ermittelt worden war (weniger 1 Gamma Mn/Ltr.)

Zur Kultur des A z o t o b a c t e r c h r o o c o c c u m diente eine Nährlösung folgender Zusammensetzung

Mannit	2%
K_2HPO_4	0.1%
$CaCO_3$	0.5%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05%
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005%
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.005%

Die fünf Actinomycetenstämme wurden auf dem von STAPP (21) wie folgt angegebenen Medium gehalten:

Glycerin	1%
Na-asparaginat	0.1%
Glucose	0.1%
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.1%
MgSO_4	0.02%
KCl	0.01%
CaCl_2	0.01%
FeCl_3	Spur
pH : 7.4	

Nach den auf Grund von Vorversuchen für geeignet befundenen Kulturzeiten wurden Bakterien und Nährlösung durch Zentrifugieren voneinander getrennt. Die abzentrifugierte Bakterienmasse wurde anschließend in aqua dest. aufgeschwemmt (zweimal) und jeweils erneut zentrifugiert. Das "Waschwasser" wurde der überstehenden Nährlösung aus der ersten Zentrifugierung zugesetzt.

Die Bestimmung des Mangans erfolgte kolorimetrisch nach der Persulfatmethode, nachdem sich Oxydation mit Perjodat als weniger geeignet erwiesen hatte : zunächst engt man Nährlösung und Bakterien am Wasserbad zur Trockne ein und zerstört darauf ihren Anteil organischer Substanzen im Muffelofen bei 600° über 30 Minuten. Der mineralische Rückstand läßt sich mit wenig konzentrierter Schwefelsäure lösen, eventuell vorhandene Chloride (würden Farbentwicklung stören) können durch kurzes Erhitzen abgeraucht werden.

Hierauf erneutes Aufnehmen (H_2SO_4 verd.) sowie Erhitzen am Wasserbad (etwa 20 Min.). Anschließend Filtrieren in geeichte Meßkölbchen und Zugabe von je 5 ml einer 20%-igen Ammoniumperoxydisulfat- sowie einer Lösung, die pro 1000 ml enthält:

AgNO_3	2.75 g
HNO_3 , konz.	200 ml
H_3PO_4 , 87%-ig	100 ml.

Nach Einpipettieren dieser Lösung Erhitzen bis zu maximaler Farbentwicklung, Abkühlen, Auffüllen zur Marke und Messung der Intensität der Permanganatfarbe im Kolorimeter (Zeiss, ELCO II) mit einem Filter maximaler Extinktion bei 533 m μ . Die Manganwerte werden durch Vergleich mit einer vorher erstellten Eichkurve ermittelt.

Versuchsergebnisse

1. B a c i l l u s s u b t i l i s

Kultur: 4 Tage bei 29° C;

Zentrifugierung: 30 min bei 3500 U / min.

Zur Untersuchung der Frage, ob Zusammenhänge zwischen pH-Wert und Mn-Aufnahme bestehen, wurden Bestimmungen außer bei optimalen pH = 6.8 auch bei pH = 5.8 sowie bei pH = 7.8 durchgeführt.

In allen Fällen zeigten die Kulturen mit Mn-Gaben gegenüber der O-Kontrolle verstärktes Wachstum. Optimale Bedingungen waren nach visueller Beurteilung zwischen 150 und 200 Gamma Mn pro 100 ml Nährlösung gegeben; die Kulturen mit 500 und noch mehr die mit 1000, sowie die mit 50 Gamma Mangan pro 100 ml Nährlösung ließen ein schwaches Nachlassen der Wachstumsfreudigkeit erkennen.

1. pH = 5.8

Zugeg. Mn¹⁾

Gefundenes Mn

	i.d. Bakterienmasse				i.d. Nährlösung		rel. Abweichung (%)	
	<u>a</u>	%	<u>b</u>	%	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
50	37.5	75	40	80	12.5	12	0.0	+4.0
150	110	73	108	72	38	40	-1.35	-1.35
250	178	71	183	73	62	64	-4.0	-1.6
500	300	60	310	62	195	186	-1.0	-0.8
1000	400	40	425	42.5	600	570	0.0	-0.5

2. pH = 6.8

Zugeg. Mn

Gefundenes Mn

	i.d. Bakterienmasse				i.d. Nährlösung		rel. Abweichung (%)	
	<u>a</u>	%	<u>b</u>	%	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
50	45	90	40	80	6	10	+2.0	0.0
150	113	75	109	72.5	31	42	-4.0	+0.66
250	190	76	183	73	61	63	+0.4	-1.6
500	320	64	320	64	180	178	0.0	-0.4
1000	480	48	470	47	518	510	-0.2	-2.0

3. pH = 7.8

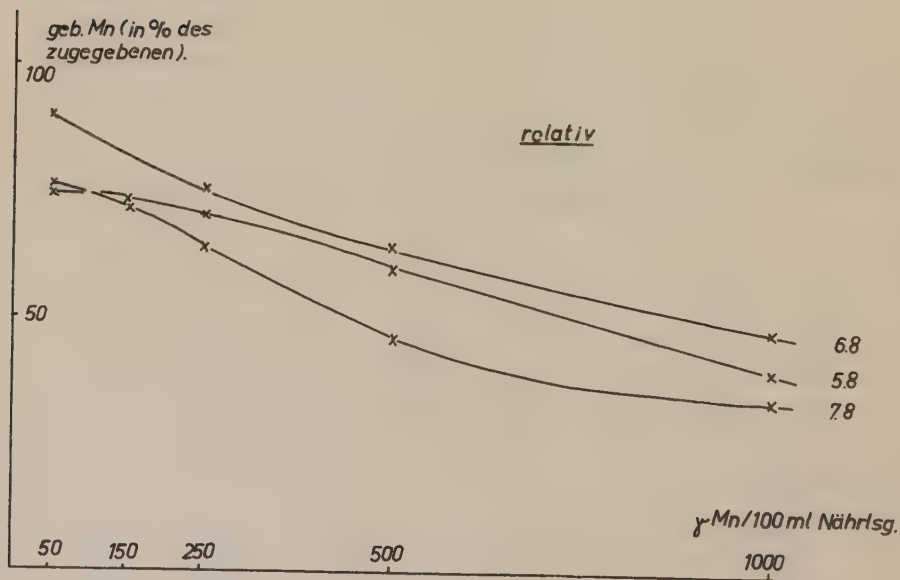
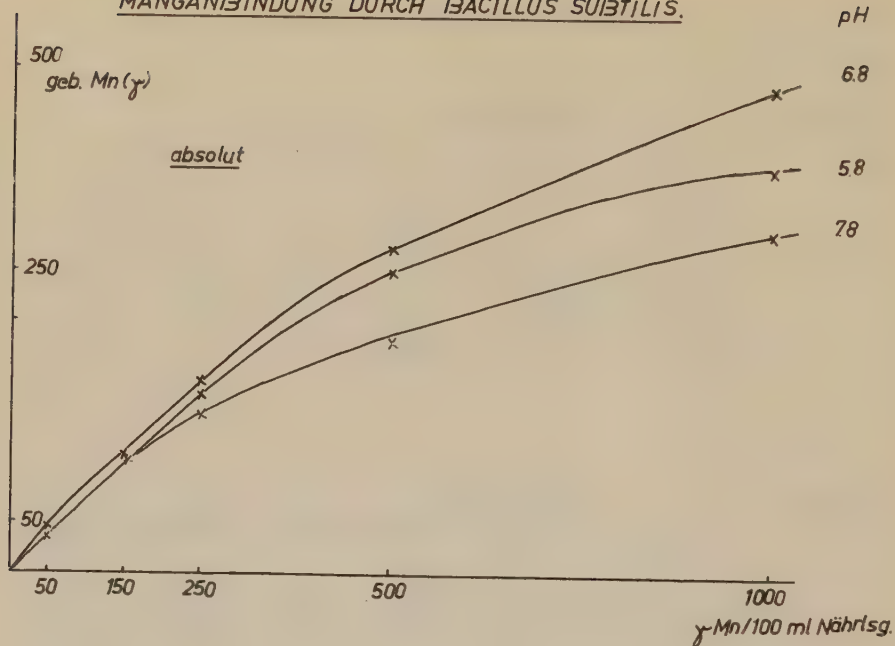
Zugeg. Mn

Gefundenes Mn

	i.d. Bakterienmasse				i.d. Nährlösung		rel. Abweichung (%)	
	<u>a</u>	%	<u>b</u>	%	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
50	40	80	38	76	8	9	-4.0	-6.0
150	107	71	108	72	41	38	-1.35	-2.66
250	165	66	160	64	83	85	-0.8	-2.0
500	273	55.5	230	46	215	275	-1.4	+1.0
1000	335	33.5	340	34	645	630	-2.0	-3.0

1) in Gamma pro 100 ml

MANGANBINDUNG DURCH *BACILLUS SUBTILIS*.



Die Versuche zeigen:

Mangan wird in beträchtlichem Maße aus der Nährlösung in den Bakterienkörper aufgenommen. Mit steigender Mangankonzentration Zunahme der absoluten und Abnahme der relativen Manganaufnahme. Höchste relative Aufnahme im Bereich optimalen Wachstums (zwischen 150 und 250 Gamma Mn/100 ml Nährlösung).

Hinsichtlich der pH-Werte:

- stärkste Mn - Aufnahme bei pH = 6.8,
- geringste Mn- Aufnahme bei pH = 7.8,
- mittlere Mn - Aufnahme bei pH = 5.8.

Diese Unterschiede dürften zurückzuführen sein auf den unmittelbaren Einfluß der verschiedenen pH - Werte auf die Wachstumsfreudigkeit des Bacillus. Die biologische Manganfixierung überlagert also innerhalb dieses pH-Bereichs noch bei weitem die rein chemisch bedingte Abnahme der Konzentration gelösten Mangans infolge Bildung schwerer löslicher Manganhydroxyde bei fallender H-Ionenkonzentration.

2. P s e u d o m o n a s f l u o r e s c e n s

Kultur: 4 Tage bei 25° C.

Zentrifugierung: 30 min bei 3500 U / min.

Sowohl bei pH = 6.2 als auch bei pH = 7.2 ergab sich bei steigenden Mangangaben eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität.

Eine Trübungsmessung (durchgeführt im ELCO II mit einem Filter maximaler Durchlässigkeit bei 549 mμ, Schichtdicke 0.498 cm) der Kulturen mit pH = 6.8 ergab - auch für die Kontrollen - bei steigender Mn-Konzentration fallende Extinktionswerte. Dies berechtigt zur Annahme eines wachstumshemmenden Einflusses der Mn-Ionen auf *Pseudomonas fluorescens* (vgl. dagegen *Bac. subt.*)

1. pH = 6.2

Zugeg. Mn¹⁾

Gefundenes Mn

	i.d. Bakterienmasse				i.d. Nährlösung		rel. Abweichung (%)	
	<u>a</u>	%	<u>b</u>	%	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
50	4	8	3	6	45	45	-2.0	-4.0
250	25	10	24	9.6	221	224	-1.6	-0.8
500	35	7	38	7.8	455	448	-2.0	-2.6
1000	88	8.8	92	9.2	910	880	-0.2	-2.8

2. pH = 7.2

Zugeg. Mn

Gefundenes Mn

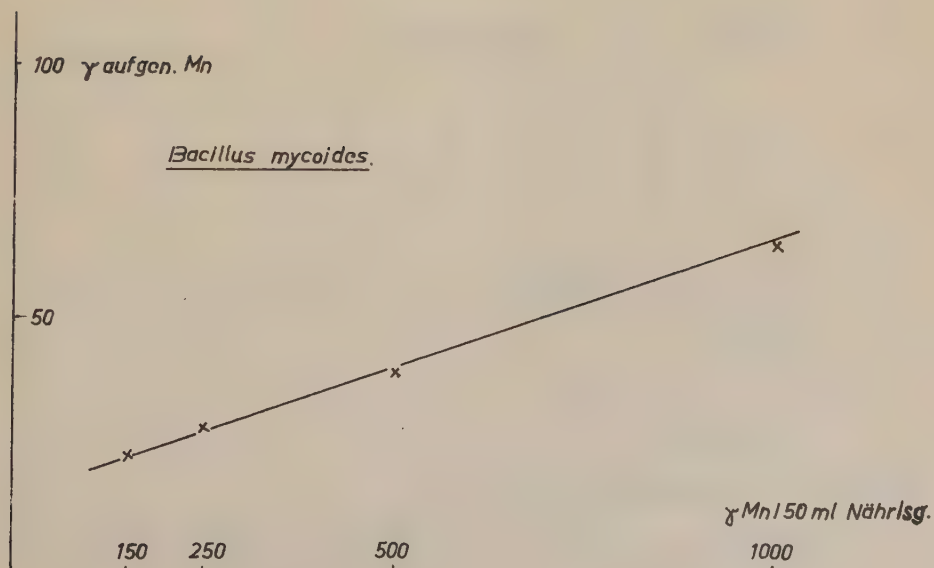
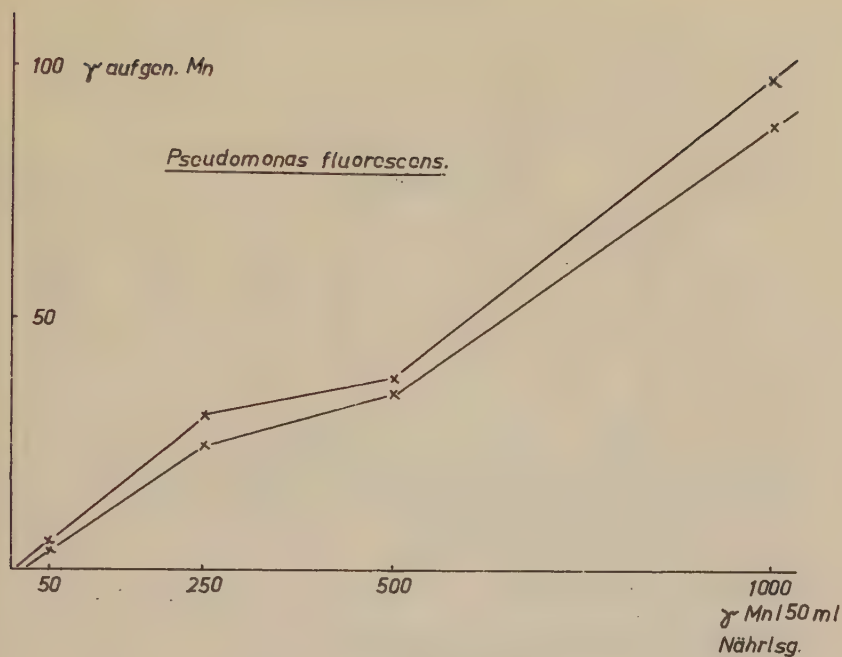
	i.d. Bakterienmasse				i.d. Nährlösung		rel. Abweichung (%)	
	<u>a</u>	%	<u>b</u>	%	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
50	5	10	4	8	44	44	-2.0	-4.0
250	31	12.4	29	11.6	214	216	-2.0	-2.0
500	37	7.4	30	6	450	455	-2.6	-3.0
1000	98	9.8	100	10	875	878	-2.7	-2.2

Die Werte der durchgeführten Bestimmungen zeigen ein schwaches Ansteigen der absoluten Mn-Aufnahme. Trotz der niedrigen absoluten Werte kann die Mn-Aufnahme kaum als eine nur scheinbare, auf methodischen Mängeln beruhende, gedeutet werden, da durch zweimaliges Waschen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht direkt von der Bakterienzelle aufgenommenes Mangan entfernt worden ist.

In Bezug auf die pH-Werte kann in Übereinstimmung mit den bei *Bacillus subtilis* gefundenen Werten eine maximale Aufnahme bei optimalem Kultur-pH (hier 7.2) festgestellt werden.

1) in Gamma pro 100 ml

MANGAN-AUFNAHME.



3. *Bacillus mycoides*

Kultur: 4 Tage bei 29° C, pH = 7.0

Zentrifugierung: 30 min bei 3500 U / min.

Zugeg. Mn¹⁾

Gefundenes Mn

	i.d. Bakterienmasse				i.d. Nährlösung		rel. Abweichung (%)	
	<u>a</u>	%	<u>b</u>	%	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
150	23	15	27	18	132	115	+3.3	-3.2
250	28.5	11.4	31	12.4	214	220	-3.2	-7.2
500	39	7.8	42	8.4	441	435	-4.0	-4.6
1000	65	6.5	67	6.7	915	905	-2.0	-2.8

Die Versuchsdaten zeigen geringe Mn-Aufnahme durch *Bacillus mycoides*. Ein Einfluß der Manganionen auf das Wachstum konnte nicht beobachtet werden.

4. *Azotobacter chroococcum*

Kultur: 8 Tage bei 28° C, pH = 7.2

Zentrifugierung: 20 min bei 11 000 U / min.

Zugeg. Mn

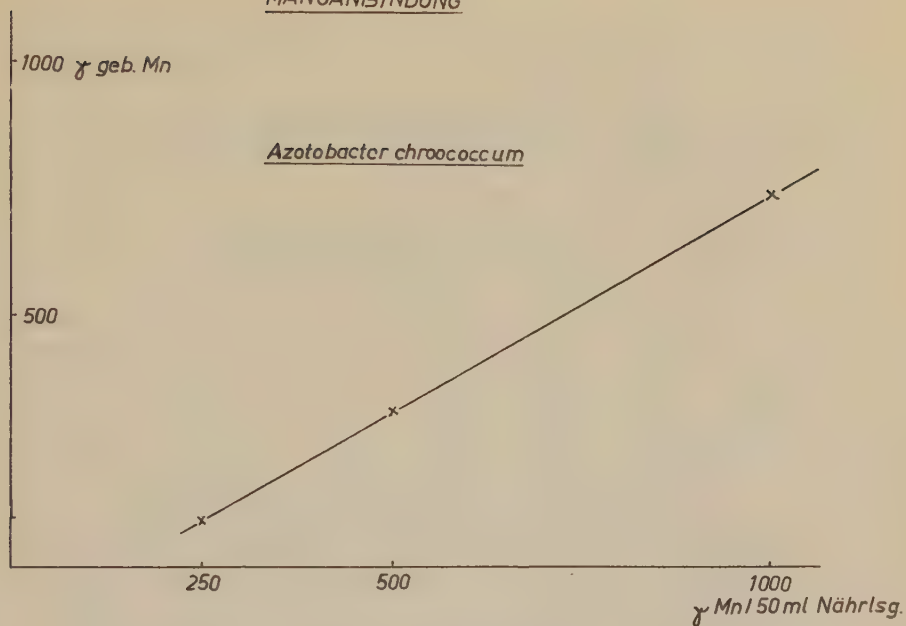
Gefundenes Mn

	i.d. Bakterienmasse				i.d. Nährlösung		rel. Abweichung (%)	
	<u>a</u>	%	<u>b</u>	%	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>a</u>	<u>b</u>
250	98	39	92	38	158	167	+2.4	+3.6
500	308	62	310	62	183	182	-1.8	-1.6
1000	742	74.2	732	73.2	244	230	-1.4	-3.8

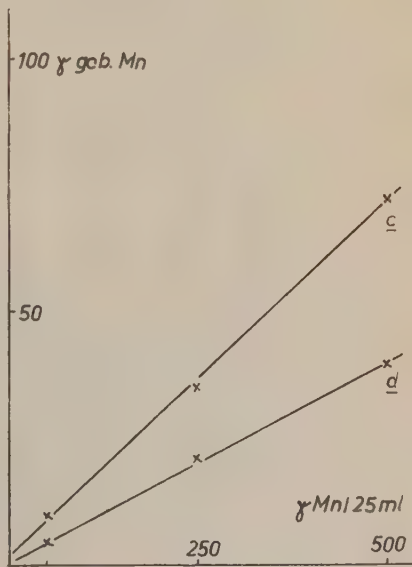
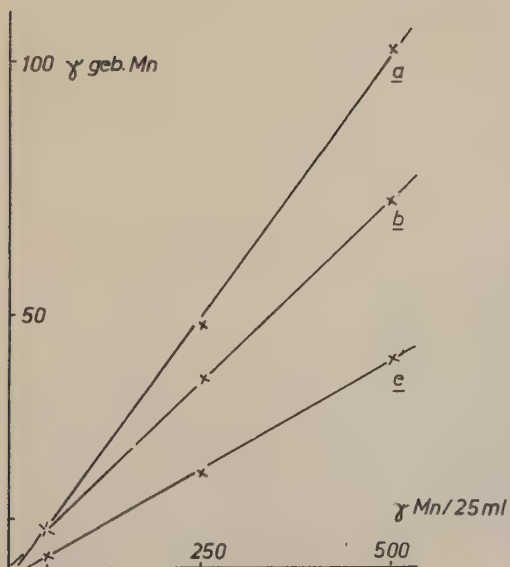
Daraus ergibt sich diesmal eine Zunahme der absoluten und der relativen Manganaufnahme mit steigender Mangankonzentration.

1) in Gamma pro 50 ml

MANGANBINDUNG



STREPTOMYCETEN.



5. Streptomyceten

Kultur: 14 Tage bei 26° C, pH = 7.4

Nach 14-tägiger Kulturzeit Trennung von der Nährlösung durch Filtration.

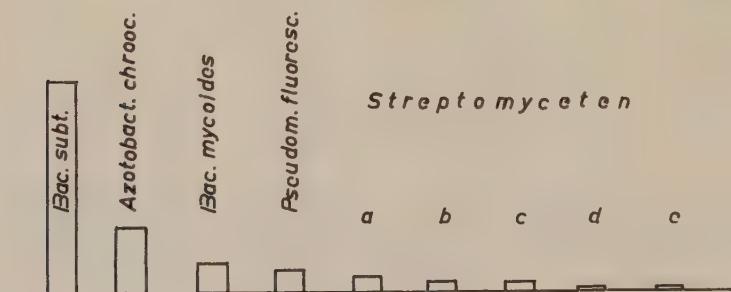
Zugeg. Mn¹⁾ i.d. Bakterienmasse gefundenes Mn

	Stämme				
	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>
50	8	8	10	5	3
250	48	38	35	21	19
500	103	73	73	40	41

Jeder der 5 Stämme nahm in geringem Maße Mangan auf. Verstärktes Wachstum der Kulturen mit Mangan gegenüber den 0-Kontrollen konnte bei den Stämmen e und d festgestellt werden.

Vergleicht man zusammenfassend die von den untersuchten Mikroorganismen bei einer Konzentration von 5 Gamma Mn / ml Nährlösung aufgenommene Manganmenge, so ergibt sich folgendes Bild:

1mm = 27γ



1) Gamma pro 25 ml Nährlösung

II. Die Art der Manganfixierung durch Bacillus subtilis

1. Extrahierbarkeit des aufgenommenen Mangans mit verschiedenen Lösungsmitteln

Im vorausgegangenen Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, daß bestimmte Mikroorganismen beträchtliche Mangang Mengen, die auch durch zweimaliges Waschen mit aqua dest. nicht aus der Bakterienmasse gelöst werden konnten, dem Milieu entziehen. Es erhebt sich nun die Frage, ob dieses bakteriell fixierte Mangan den Wurzeln höherer Pflanzen noch zugänglich ist. - In der Praxis der Bodenanalyse ist seit langem bekannt, daß direkte Beziehungen zwischen dem Gehalt des Bodens an Gesamtangan und der Versorgung der Pflanzen mit diesem mineralischen Wirkstoff häufig nicht gegeben sind. Zur Ermittlung der Menge des für die Beurteilung der Manganversorgung allein wichtigen, v e r - f ü g b a r e n Mangans ist der Vegetationsversuch im allgemeinen zu langwierig und teuer; deshalb wurde eine Reihe von Extraktions- und Austauschmethoden ausgearbeitet, die besonders enge Beziehungen zwischen dem von der Pflanze aufgenommenen und dem mit der betreffenden Methode im Boden bestimmten Mangan erkennen lassen. - Im folgenden Teil der Untersuchungen wurde mit drei verschiedenen Methoden der Bodenanalyse die Bakterienmasse auf Extrahier- bzw. Löslichkeit des aufgenommenen Mangans geprüft. Und zwar hinsichtlich des Anteils ihres Mangangehalts an

aktivem (nach SCHACHTSCHABEL (40)),

leicht reduzierbarem (nach JONES und LEEPER sowie
SCHACHTSCHABEL) und

heißwasserextrahierbarem (nach ROTH und PFAFF (43) Mn.

Die zur Untersuchung verwendeten Mikroorganismen stammten aus 4 Tage alten, bei 37° C in 50 ml Standard-II-Bouillon mit 1000 Gamma Mangan gehaltenen Kulturen. Sie wurden abzentrifugiert, in 200 ml Erlenmeyerkolben überführt, in 50 ml aqua dest. suspendiert, 15 Minuten lang geschüttelt und hierauf erneut zentrifugiert.

Zur Ermittlung des Anteils "aktiven Mangans" (=austauschbares + leicht reduzierbares Mangan) wurden die gewaschenen Bakterien nach den Angaben SCHACHTSCHABELs (40) mit 50 ml einer Lösung bestehend aus (pro 1000 ml aqua dest.):

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	123.8 g
$\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.0 g
NaHSO_3	1.0 g

sowie 5 ml einer 0.1%-igen AgNO_3 -Lösung eine Stunde lang geschüttelt, anschließend zentrifugiert und zweimal mit aqua dest. gewaschen. (Waschwasser der Fraktion des "aktiven Mangans" zugeführt). Die Verteilung der ursprünglich der Nährlösung zugesetzten 1000 Gamma Mangan auf die Fraktionen des nicht aufgenommenen (in der Nährlösung verbliebenen), des aktiven und des von den Bakterien zurückgehaltenen, also nicht aktiven Mangans, ist aus folgender Tabelle ersichtlich; (Mangan in Gamma):

Probe:	1	2	3	4	5	Mittel
Mn/50 ml Nährlsg.	1000	1000	1000	1000	1000	
Nicht aufgen. Mn	400	445	410	425	435	423
Aktives Mn	220	260	225	255	230	238
Gebundenes Mn	265	265	240	270	255	259
	885	970	875	950	920	

Die Fraktion des "aktiven" Mangans setzt sich zusammen aus austauschbarem und leicht reduzierbarem Mangan. Letzteres kann in bestimmten Bodentypen (Podsole) bei Ansteigen des pH über 6 besonders wichtig werden, da mit fallender H-Ionenkonzentration nach FINCK (41) der Anteil des austauschbaren Mangans wesentlich rascher abnimmt als der des leicht reduzierbaren. In diesem

pH-Bereich muß mit starker mikrobieller Aktivität gerechnet werden. Deshalb erschien es von Interesse, die Bakterienmasse auch auf ihren Anteil an leicht reduzierbarem Mangan hin zu untersuchen.

Die Bestimmungen wurden durchgeführt entsprechend den Angaben von JONES und LEEPER (42) sowie von SCHACHTSCHABEL (40):

die wie beschrieben vorbehandelten Bakterien wurden eine Stunde lang geschüttelt mit einer frisch bereiteten Lösung von (pro 1000 ml aqua dest.)

$Mg(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$ 128.8 g

Hydrochinon 2.0 g,

anschließend zentrifugiert und zweimal gewaschen.

Für die einzelnen Fraktionen konnten folgende Manganwerte ermittelt werden (Mangan in Gamma):

Probe:	1	2	3	4	5	Mittel
Mn/50 ml, Nährlsg.	1000	1000	1000	1000	1000	
Nicht aufgen. Mn	410	470	460	440	455	447
Leicht reduzierb. Mn	150	160	155	160	155	156
Nicht leicht reduz. Mn	290	300	325	285	330	306
	850	930	940	885	940	

Schließlich wurden die Bakterien auf ihren Gehalt an heißwasserextrahierbarem Mangan geprüft. ROTH und PFAFF hatten in neueren Untersuchungen (43) nur unbefriedigende Beziehungen zwischen dem mit den eingeführten Austausch- und Verdrängungsmethoden bestimmten Bodenmangan und dem Mangan der Versuchspflanzen (*Avena sativa*) feststellen können. Bessere Übereinstimmung erhielten sie nach einstündiger wässri-

ger Extraktion der Probe bei 100° C. Entsprechend ihren Angaben für Boden wurde die Bakterienmasse in einem 200 ml - Erlenmeyerkolben mit 50 ml H₂O aufgeschwemmt, im Wasserbad auf 100° C erhitzt und anschließend unter Umschütteln in zehnminütigem Abstand eine Stunde lang extrahiert. Nach Zentrifugieren und Waschen wurde das Mangan des Heißwasserextraktes sowie der abzentrifugierten Bakterienmasse bestimmt (Mangan in Gamma):

Probe:	1	2	3	4	5	Mittel
Mn/50 ml Nährlsg.	1000	1000	1000	1000	1000	
Nicht aufgen. Mn	420	400	410	425	430	417
Heißwasserextrahierbar.	205	225	255	235	220	228
Nicht heißw. extrahierbar.	290	240	275	255	285	269
	915	865	940	915	935	

Trotz dieser wenig schonungsvollen Behandlungsweise blieb auch hier eine beachtliche Manganmenge in der Bakterienmasse zurück.

Ein Vergleich der nach den drei beschriebenen Methoden ermittelten Versuchsdaten ergibt:

von dem nach 15-minütigem Schütteln mit aqua dest. und anschließendem Zentrifugieren in der Bakterienmasse verbliebenem Mangan betrug der Anteil an (Mittelwerte):

	Mn (Gamma)
leicht reduzierbarem,	156
heißwasserextrahierbarem,	228
aktivem Mangan	238.

Mit diesen Methoden nicht von der Bakterienmasse
abtrennbare Manganmenge:

	Mn (Gamma)
nicht leicht reduzierbar,	306
nicht heißwasserextrahierbar,	269
nicht aktiv,	259

Dabei erscheinen drei Tatsachen bemerkenswert:

1. Mit keiner der drei angewendeten Methoden kann von der Gesamtmenge des aufgenommenen Mangans mehr als die Hälfte erfaßt werden (aktiv: 48%, heißwasserextrahierbar: 46%, leicht reduzierbar: 33.5%).
2. Die Fraktion des "aktiven Mangans" besteht zu $\frac{2}{3}$ aus leicht reduzierbarem Mangan.
3. Die Werte für aktives und heißwasserextrahierbares Mangan liegen nahe zusammen.

Punkt 2 kommt insofern besondere Bedeutung zu, als die Umsetzungsgeschwindigkeit des leicht reduzierbaren Mangans zum Mangan-II nach den Angaben verschiedener Forscher nur relativ gering ist, und ihr Wirkungswert (Verfügbarkeit) daher nach FINCK (41) nur etwa $\frac{1}{20}$ der nach Reduktion mit Hydrochinon ermittelten Werte erreicht. Diese Fraktion steht somit den Pflanzen nur zu einem geringen Teil zur Verfügung.

Um eventuell auf optischem Wege näheren Aufschluß über die Art der Manganfixierung zu erhalten, wurden Proben aus Kulturen verschiedenen Mangangehalts (4 Tage alt) phasenkontrastmikroskopisch (Vergrößerung 1080 fach) sowie elektronenoptisch (Vergrößerung 10 000 fach) untersucht.

Dabei konnten Anzeichen einer Manganablagerung in die Membran oder in nähere Umgebung der Zellen in keinem Falle festgestellt werden. Die Möglichkeit einer örtlichen Deponierung von Mangan im Zellinneren läßt sich wegen der geringen Durchstrahlbarkeit der grampositiven Bakterien-

wände nicht ausschließen. - Im Verlauf dieser mikroskopischen Untersuchungen ergab sich eine deutliche Abhängigkeit des Verhältnisses zwischen Stäbchen und Sporen von der Mangankonzentration des Mediums. Kulturen ohne Mangan sind äußerst sporenarm; das Optimum der Sporulation liegt bei einer Mangankonzentration von 2 Gamma Mn / ml, höhere sowie geringere Manganmengen vermindern den relativen Sporenanteil. - Auf die Notwendigkeit der Manganionen für die Sporulation ist bereits von verschiedenen Forschern hingewiesen worden (CHARNEY et al. (23), CURRAN und EVANS (24), WEINBERG (26)). Es war nun naheliegend, diese Beobachtungen in Zusammenhang mit der Manganfixierung zu bringen. Dazu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

2. Manganaufnahme und Sporulation.

Methode.

In 200 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml Standard-II-Nährbouillon wurde jeweils eine genau gleiche Menge sporenarmen Impfgutes eingebracht (aus 10 Stunden alten Suspensionen, die mit Bakterien von 1 Tag alten Kulturen auf Schrägagar beimpft worden waren). Die Bebrütung erfolgte auf dem Schüttelapparat (bei 25° C), um durch Verhinderung der Kahmhautbildung eine homogene Suspension zu erhalten. Nach 2, 3, 4 und 6 Tagen wurden jeweils folgende Bestimmungen durchgeführt:

1. Ermittlung der Gesamtkeimzahl sowie der Zahl der Sporen (Abtöten der vegetativen Keime durch 12-minütiges Erhitzen bei 85° C) nach Herstellung von Verdünnungsreihen mit Hilfe der KOCHschen Plattenmethode. Die in der Tabelle aufgeführten Zahlen wurden durch Bildung des Mittelwertes aus 6 gleichzeitig angesetzten Proben gewonnen.
2. Feststellung der gebildeten Eiweißmenge nach der KJELDAHL-Methode.

3. Bestimmung der Menge nicht kaltwasserextrahierbaren Mangans.

Es ergaben sich folgende Resultate:

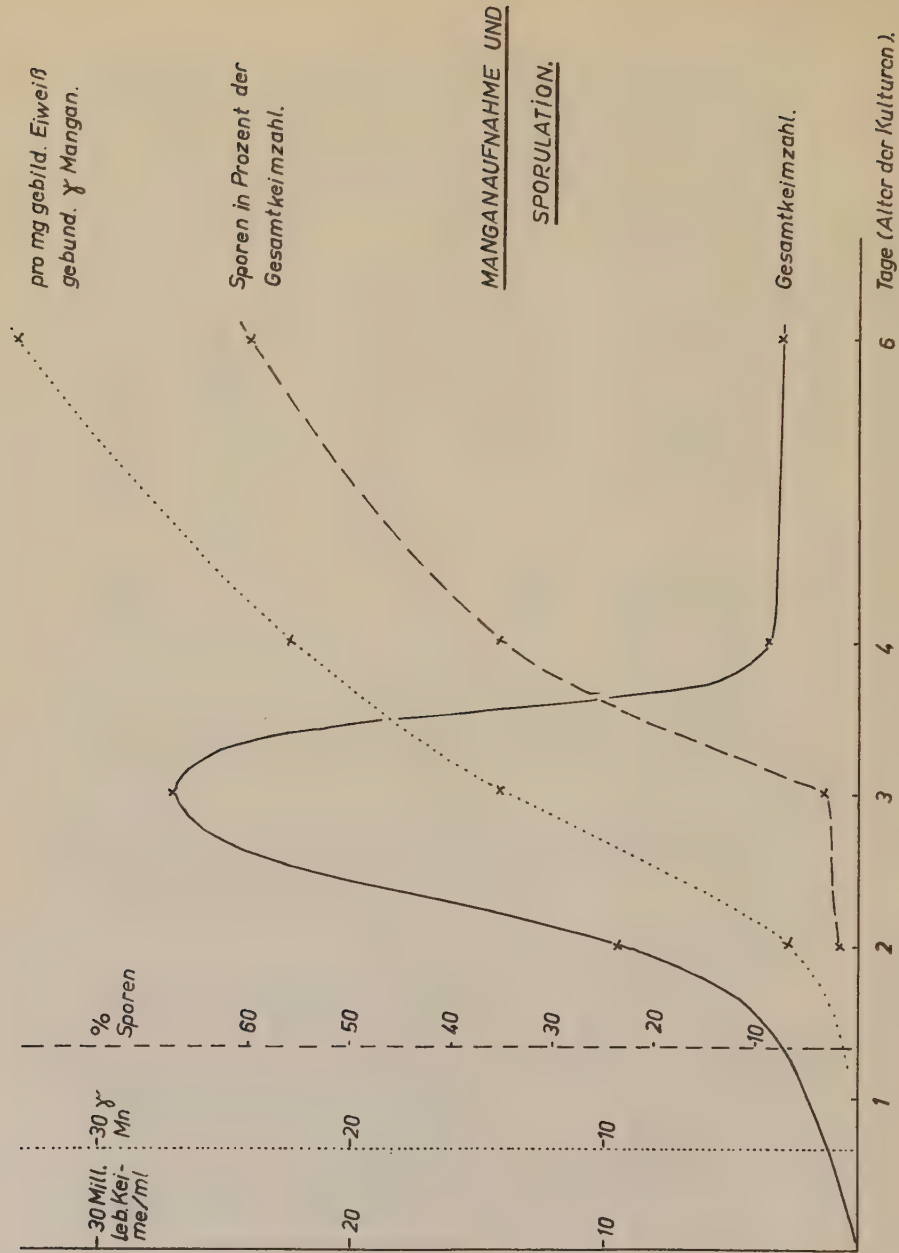
Alter der Kulturen (Tage)	2	3	4	6
Gesamtkeimzahl / ml ¹⁾	9.5 Mio	27.0 Mio	3.4 Mio	3.0 Mio
Sporen / ml	192 000	856 000	1.2 Mio	1.8 Mio
Sporen in % der GKZ	2.02	3.15	35.29	60.0
Gebild. Eiweiß (mg/50 ml)	30.19	13.13	8.75	4.81
Nicht kaltwasserextrahierb. Mn (50 ml)	85	184	196	160
Pro mg Eiweiß aufgen. Mn (Gamma)	2.82	14.01	22.4	33.26

Aus der graphischen Darstellung der Versuchsdaten geht hervor:

Bis zum dritten Tage verlaufen die Kurven für Manganaufnahme, Gesamtkeim- und Sporenzahl etwa gleichsinnig. Ob die (am zweiten Tag merklich einsetzende) Sporenbildung beträchtlichen Einfluß auf die Manganfixierung ausübt, läßt sich zu diesem Zeitpunkt nicht entscheiden.

Der steile Abfall der Gesamtkeimzahl ¹⁾ zwischen dem dritten und vierten Tag kommt im Verlauf der Manganaufnahmekurve nicht zum Ausdruck. Somit hat am vierten Tag eine erheblich geringere Zahl von Keimen (3.4 Mill.) mehr Mangan inaktiviert als die wesentlich höhere Keimzahl (27 Mill.) des Vortages; die Bindungsfähigkeit pro Keim muß also beträchtlich zugenommen haben. Wegen des gleichzeitigen plötzlichen Anstiegs der Sporenzahl kann der Prozeß der Sporenbildung für diese vergrößerte Aufnahme verantwort-

1) Zahl der lebenden Keime



lich gemacht werden, zumal für die Annahme einer spontanen Erhöhung der Manganaufnahmefähigkeit der vegetativen Keime auf das über Zehnfache keinerlei Grund besteht.

Quantitativ stellen sich die Verhältnisse folgendermaßen dar:

Der größte Sprung des prozentualen Sporenanteils an der Gesamtkeimzahl liegt zwischen dem dritten und dem vierten Tag. Dieser plötzlichen Zunahme des Sporenanteils parallel geht eine ebenso ruckartige Erhöhung der Manganaufnahme im Vergleich zum Vortag:

	3. Tag	4. Tag
% Sporen	3.15	35.29
Pro Keim festgelegtes Mn (in Gamma)	$1.362 \cdot 10^{-7}$	$11.528 \cdot 10^{-7}$

Dies entspricht einer 8.46 mal größeren Manganbindung pro Keim. Die von einer Spore tatsächlich aufgenommene Manganmenge dürfte beträchtlich höher liegen, da sich die in die Umrechnung für das pro Keim festgelegte Mangan eingesetzte Keimzahl zu mehr als der Hälfte aus vegetativen Formen zusammensetzte, deren Bindungsvermögen - wie der Übergang vom dritten zum vierten Tag zeigt - sicher weit unter demjenigen der versporteten Formen liegt.

Zusammenfassend läßt sich sagen: wenn diese aus in-vitro-Versuchen gewonnenen Ergebnisse über die Art der Manganspezifisierung auch nur unter Vorbehalt mit den natürlichen Verhältnissen des Bodens in Vergleich gebracht werden können, geben sie doch Grund zur Annahme, daß Mikroorganismen im Boden in einer Art Konkurrenz mit den Wurzeln höherer Pflanzen - zumindest vorübergehend - Mangan (das in der Regel in Form des wasserlöslichen Mangan-II-sulfats gegeben wird) relativ stabil fixieren und für die Wurzeln höherer Pflanzen schwer erreichbar machen.

III. Physiologische Wirkungen des Mangans bei Bacillus subtilis.

Das in den vorangegangenen Untersuchungen festgestellte hohe Manganbindungsvermögen von *Bacillus subtilis* ließ es wünschenswert erscheinen, die Wirkung der Mangankationen auf diesen Stamm weiter zu verfolgen; im besonderen sein Verhalten gegenüber verschiedenen Mangangaben in Flüssigkeitskultur, da die Angaben hierüber in der bakteriologischen Literatur z.T. beträchtlich voneinander abweichen. So stellten CHARNEY et al. (23) im näheren Umkreis von mit $MnCl_2$ -Lösung getränkten Filtrierpapierscheiben bei 8 von 9 untersuchten *Bacillus*-arten (darunter *Bacillus subtilis*) neben erhöhter Sporulation auch beträchtliche Wachstumsstimulation fest. Im Gegensatz zu den Befunden der Scheibendiffusionsmethode konnten von diesen Untersuchern in Flüssigkeitskulturen auf Grund von Trübungsmessungen Wachstumsförderungen nach 24-stündiger Kultur nicht beobachtet werden. - WEINBERG (26) fand ebenfalls nach Zugabe von Mangan wesentlich erhöhte Sporulation und berichtet gleichzeitig: "neither growth nor the alkaline pH-shift was affected by initial or subsequent addition to broth of $10^{-9}M$ to $10^{-3}M$ Mn." Die von LEVINSON und HYATT (27) bei *Bacillus megatherium* nach 20 Stunden ausgeführten Trübungsmessungen erbrachten - im Gegensatz zu den Ergebnissen von CHARNEY et al. (23) - für die Kulturen mit Mangan deutlich höhere Werte.

Auf Grund dieser sich teilweise widersprechenden Beobachtungen sollte der Einfluß verschiedener Mangangaben auf die Substanzbildung bei *Bacillus subtilis* an Hand einer größeren Serie untersucht werden.

1. Eiweißsynthese, Farbstoffbildung und Reaktions-
verschiebung bei Bacillus subtilis in Abhängig-
von Mangan.

Wie erwähnt, ließ schon grob visuelle Beurteilung der Versuche über die Manganaufnahme ein Wachstumsoptimum bei Gaben von 1.5 bis 2 Gamma Mn / ml erkennen. Ober- und unterhalb dieser Konzentration nahm die Menge der gebildeten Bakterienmasse offensichtlich ab. Auf Grund der erwähnten Widersprüche und im Hinblick auf eine eventuelle Verwendung dieses Organismus für einen biologischen Mangan - Bodentest, war es von Bedeutung, den Verlauf der Wachstumskurve genauer zu verfolgen.

Wegen der verhältnismäßig geringen gebildeten Bakterienmasse kam Trockengewichtsbestimmung als zwar einfache, doch relativ grobe Methode nicht in Frage. So wurde der verschiedene Bakterienzuwachs auf Grund des nach der KJELDAHL - Methode bestimmten Stickstoffs der abzentrifugierten und gewaschenen Bakterien ($N \times 6.25 = \text{Eiweiß}$) verglichen.

Versuchsprotokoll siehe nächste Seite!

Die ermittelten Werte zeigen - in guter Übereinstimmung mit der visuellen Beurteilung - ein Wachstumsoptimum bei 2 Gamma Mn / ml Nährlösung. Der Anstieg zum Maximum verläuft steil, der Abfall als Folge supraoptimaler Konzentrationen allmählich. Beachtlich und überraschend erscheint die erstaunlich hohe Empfindlichkeit und das feine Reaktionsvermögen des Bacillus gegenüber geringsten Manganmengen. Selbst bei Gaben von nur 0.001 Gamma / ml war noch eine deutliche Anregung der Eiweißsynthese feststellbar. Es erscheint in diesem Zusammenhang wahrscheinlich, daß die Kultur von Bacillus subtilis völlig ohne Mangan unmöglich ist. Auf Grund eigener Untersuchungen war der Mangangehalt von 1000 ml Nährlösung geringer als die kleinste, mit der angewendeten Manganbestimmungsmethode

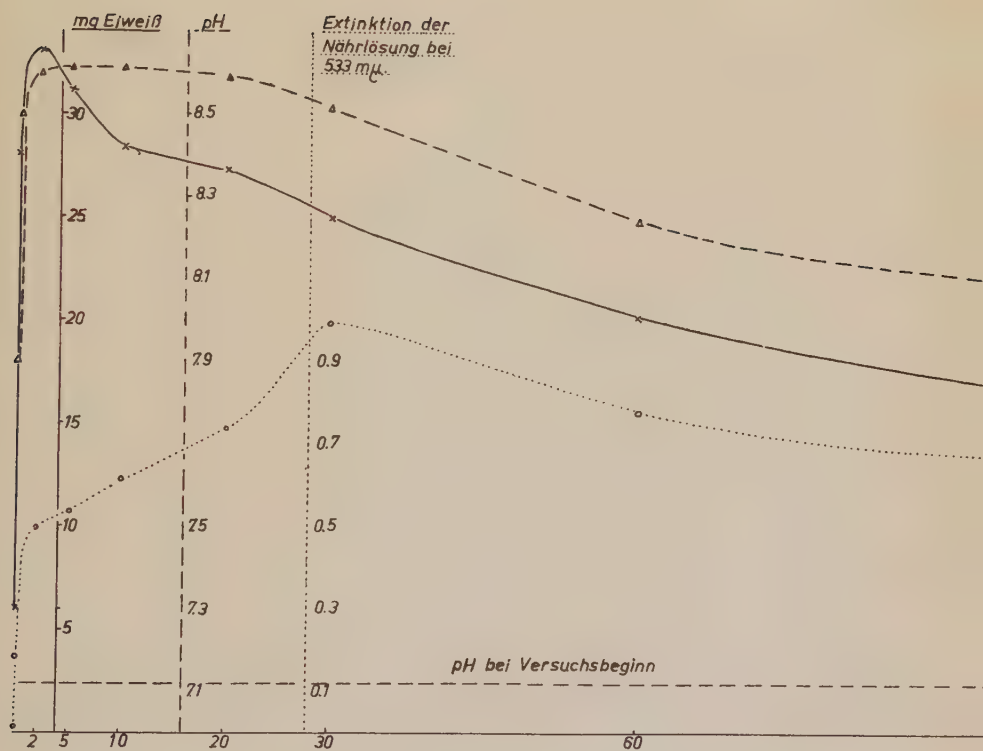
noch erfaßbare Menge (0.04 Gamma / ml); nach Mitteilung von MERCK liegt der Mangengehalt der Standard-II-Bouillon unter 0.001 Gamma / ml.

Eiweißbildung in Abhängigkeit von der Mangankonzentration

<u>Mn</u>	<u>KJELDAHL-N</u>		<u>pH-Wert</u>		<u>Extinktion</u> ¹⁾
Gamma/ml	mg N	mg Eiweiß (N x 6.25)	bei Ver- suchsbe- ginn	nach 4 Tagen	nach 4 Tagen
0.001	0.81	5.05			
0.001	0.84	5.25			
0.002	0.89	5.55			
0.005	1.4	8.75			
0.01	2.24	14.00			
0.02	3.86	24.00			
0.001	0.84	5.25	7.12	7.90	0.011
0.02	3.44	21.5	"	8.30	0.0375
0.2	4.48	28.0	"	8.50	0.185
2	5.29	33.0	"	8.60	0.496
5	5.0	31.2	"	8.61	0.53
10	4.54	28.4	"	8.61	0.612
20	4.4	27.5	"	8.59	0.78
30	4.0	25.0	"	8.52	0.985
60	3.24	20.3	"	8.25	0.78
100	2.64	16.5	"	8.15	0.67
200	1.28	8.0	"	7.75	0.336

Gleichzeitig mit unterschiedlicher Eiweißsynthese entsprechend verschiedenen Mangangaben war bei Vergleich der Kulturen auch eine Abstufung der Färbung des Nährmediums zu beobachten (s. Protokoll und Kurve auf Seite 33). Ihr Maximum fällt nicht mit dem der Wachstumskurve zusammen, es liegt bei 20 Gamma / ml. Vor dem Maximum steigt die Farbtintensität rasch an, danach (vgl. Eiweißsynthese !)

1) der Nährlösung nach Abzentrifugieren der Bakterien.
Gemessen gegen unbeimpfte manganfreie Nährlösung.



FLUSS GESTUFTER MANGANGAIBEN ($< 0.001 - 200 \gamma/ml$) AUF

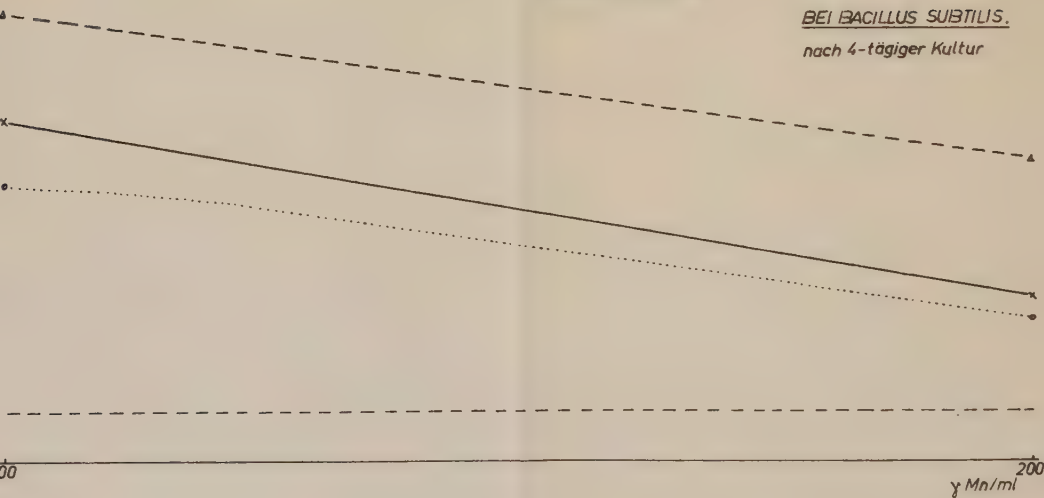
EIWEISSYNTHESE ———

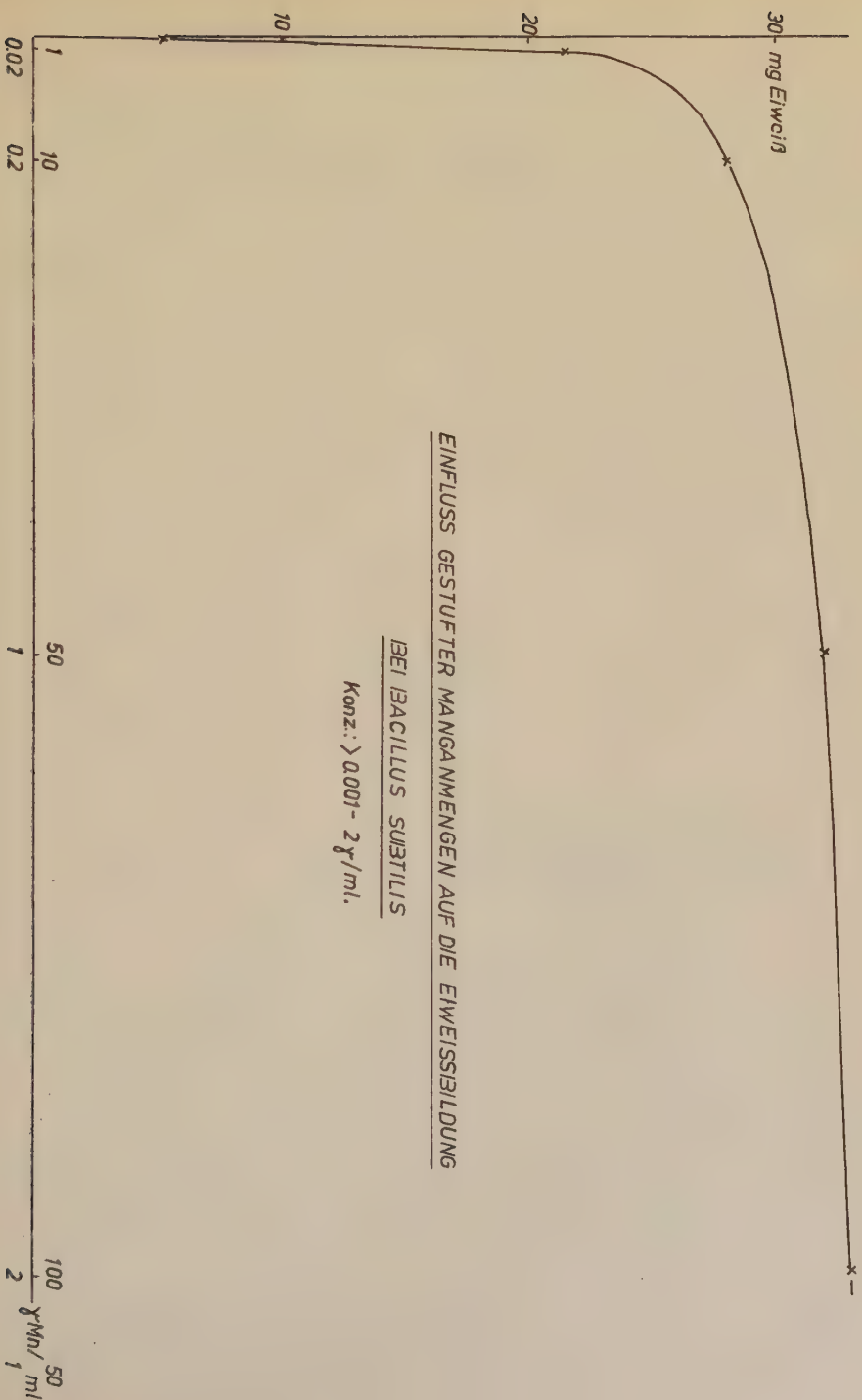
ALKALISIERUNG - - -

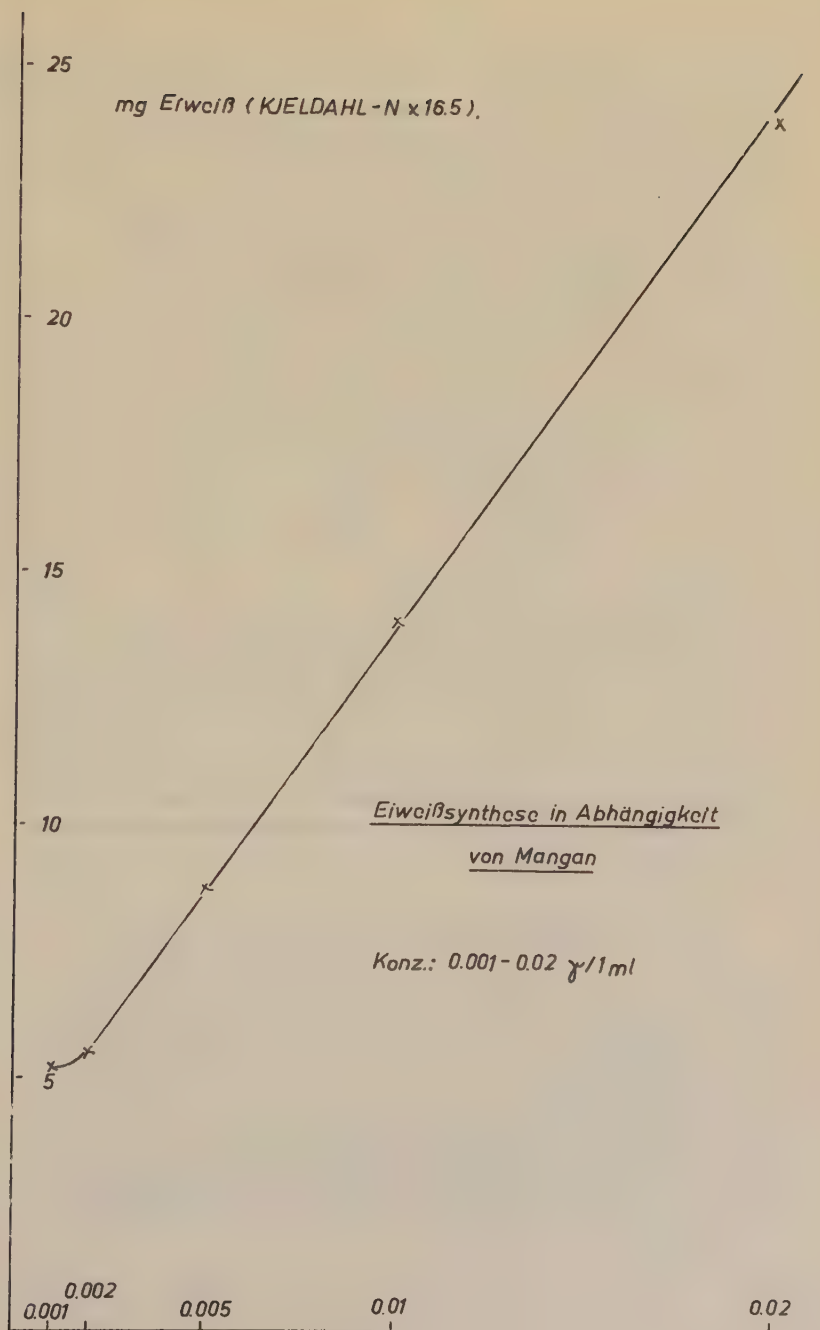
FARBSTOFFBILDUNG ·····

BEI BACILLUS SUBTILIS.

nach 4-tägiger Kultur







nimmt sie allmählich ab und erweist sich auch noch gegenüber niederen Mn-Konzentrationen relativ empfindlich. In den Kulturen mit maximaler Farbstoffbildung konnten besonders häufig ausgelaufene Bakterienzellen ("ghosts") beobachtet werden. Dies weist auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des Farbstoffs und Autolysevorgängen hin. Tyrosinzusätze zum Medium bewirkten eine schwache, Tryptophangaben eine starke Steigerung der Farbtintensität, während Cystein eine leichte Abschwächung verursachte. Photometrische Messungen ergaben zunehmende Extinktionswerte bei fallendem Durchlässigkeitsmaximum der Filter, die höchste Extinktion lag bei $423\text{m}\mu$. Ob es sich bei diesem Farbstoff um einen Körper melaninartigen Aufbaus handelt, soll außerhalb des Rahmens dieser Arbeit durch weitere Untersuchungen ermittelt werden.

Schließlich wurde der "pH-shift" in den verschiedenen Kulturen gemessen (Glaselektrode). Auch die pH-Kurve zeigt mit zunehmender Konzentration einen steilen Anstieg bis $2 \text{ Gamma Mn} / \text{ml}$, bleibt bis etwa $10 \text{ Gamma} / \text{ml}$ horizontal und verläuft dann im wesentlichen parallel zur Eiweißkurve. Es ist anzunehmen, daß maximale N-Produktion und stärkste Reaktionsverschiebung lediglich infolge der geringen Empfindlichkeit der letzteren gegenüber kleinen Mn-Konzentrationsunterschieden (Plateau anstelle eines Maximums) nicht zusammenfallen. -

2. Beeinflussung der Dauer der Latenzphase des Wachstums durch Manganionen.

Nachdem mit Hilfe von Stickstoffbestimmungen der Stand der Eiweißsynthese nach viertägiger Kulturdauer ermittelt worden war, sollte der Einfluß der verschiedenen Mangangaben auf die Zellvermehrung während der ersten 24 Stunden nach Beimpfung (Übergang zwischen "lag"- und "log"- Phase des Wachstums) genauer verfolgt werden, um daraus eventuell Anhaltspunkte für die Wirkungsweise der Manganionen zu finden.

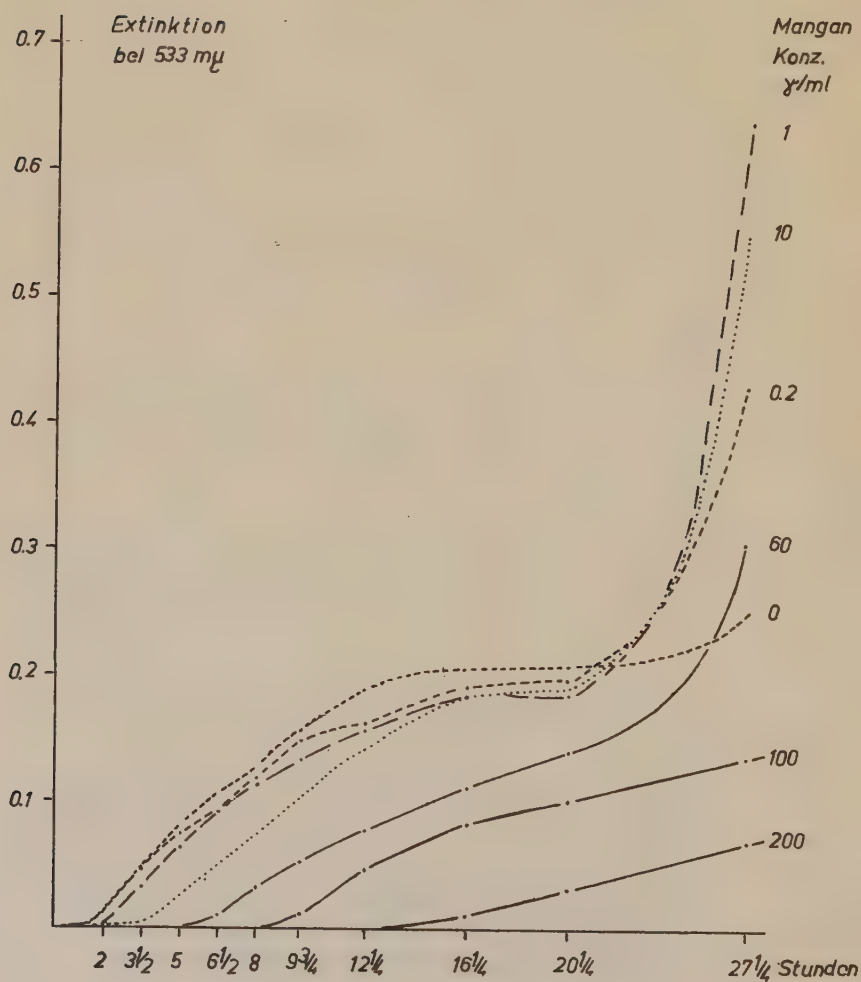
Methode.

Genau gleiche Mengen Impfgut wurden in 200 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Nährlösung und Mangangaben von 0, 0.2, 1, 10, 60, 100, 200 Gamma pro ml einpipettiert. In den aus der graphischen Darstellung ersichtlichen Zeitabständen wurden den Kulturgefäßen mit einer sterilen Rekordspritze 4 ml Suspension entnommen und ihr Trübungswert im Elco II mit einem Filter maximaler Durchlässigkeit bei 533 μ gemessen. Die Kulturgefäße kamen jeweils sofort nach Entnahme der Meßflüssigkeit wieder in den Brutschrank (36° C). Die verhältnismäßig hohe Bebrütungstemperatur sollte durch Beschleunigung des Anwachsens die Versuchsdauer abkürzen, da aus technischen Gründen Messungen nur während einer Nacht durchgeführt werden konnten.

Die graphisch dargestellten Versuchsdaten ergeben folgendes:

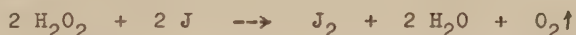
1. die Zeitspanne zwischen Impfung und dem ersten Auftreten einer meßbaren Trübung des Mediums war in allen Kulturen mit Mangangaben größer als in der O-Kontrolle.
2. Während der ersten 20 Stunden des Versuchs lagen die Trübungswerte sämtlicher Kulturen mit Manganzusatz unterhalb denjenigen der O-Kontrolle, und zwar ist diese Verzögerung des Anwachsens (Verlängerung der Latenzphase des Wachstums) um so größer, je höher die zugegebene Mangankonzentration war.
3. die in früheren Versuchen festgestellte, wachstumsfördernde Wirkung der Manganionen wird im günstigsten Falle erst 20 Stunden nach der Beimpfung meßbar. Zu diesem Zeitpunkt sind die Trübungswerte der Kulturen mit 100 und 200 Gamma pro ml noch kleiner als diejenigen der O-Kontrolle; auf Grund der nach 4 Tagen festgestellten höheren Stickstoffwerte folgt jedoch, daß auch sie noch zum Schnitt mit der O-Kurve kommen.

VERLAUF DER TRÜBUNG IN KULTUREN MIT VERSCHIEDENEN
MANGANGABEN WÄHREND DER ERSTEN 27 STUNDEN
NACH DER BEIMPFUNG.



3. Beziehungen zwischen Mangan und Katalaseaktivität.

Schließlich sollte im Anschluß an die Versuche über die Eiweißsynthese und den Verlauf der Wachstumskurve nachgeprüft werden, ob Mangan auch die Aktivität wichtiger Fermente, hier der Katalase, beeinflußt. Dazu wurden Subtiliskulturen verschiedenen Mangangehalts hinsichtlich ihrer Katalaseaktivität nach folgender Methode untersucht: den auf pH 7.0 gepufferten Kulturen wird eine bestimmte Menge H_2O_2 bekannter Konzentration zugesetzt. Nach 20 Minuten erfolgt die Bestimmung des von der Katalase nicht zerstörten H_2O_2 . Dazu gibt man zur Probe 25 ml 0.2n KJ-Lösung sowie 20 ml 2n Schwefelsäure. In der sauren Lösung reagiert unzerstört gebliebenes H_2O_2 mit dem KJ gemäß



und setzt eine seiner Oxydationskraft äquivalente Menge J_2 frei (katalytische Beschleunigung durch Zugabe einiger Tropfen einer ln-Ammoniummolybdatlösung). Diese Jodmenge wird mit Natriumthiosulfatlösung titrimetrisch bestimmt.

Katalaseaktivität nach 4 Tagen.

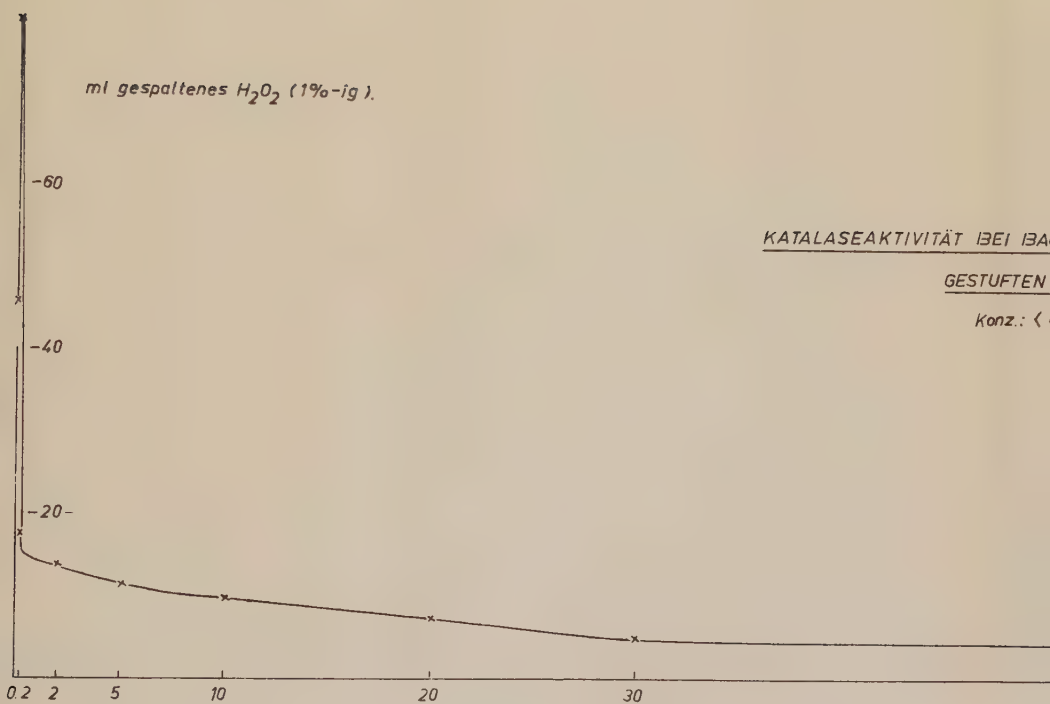
Mn in Gamma pro ml	Zersetztes H_2O_2 ml 1%-iger Lösung
0.001	46.0
0.01	52.0
0.02	56.1
0.1	36.0
0.2	18.2
1	15.7
2	14.2
5	11.3
10	10.45
20	7.65
30	5.1
60	4.75
100	4.42
200	3.24

KATALASEAKTIVITÄT BEI 13A

GESTUFTEN

Konz.: <

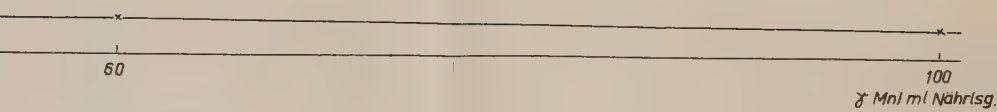
ml gespaltenes H_2O_2 (1%-ig).



SUBTILIS IN ABHÄNGIGKEIT VON

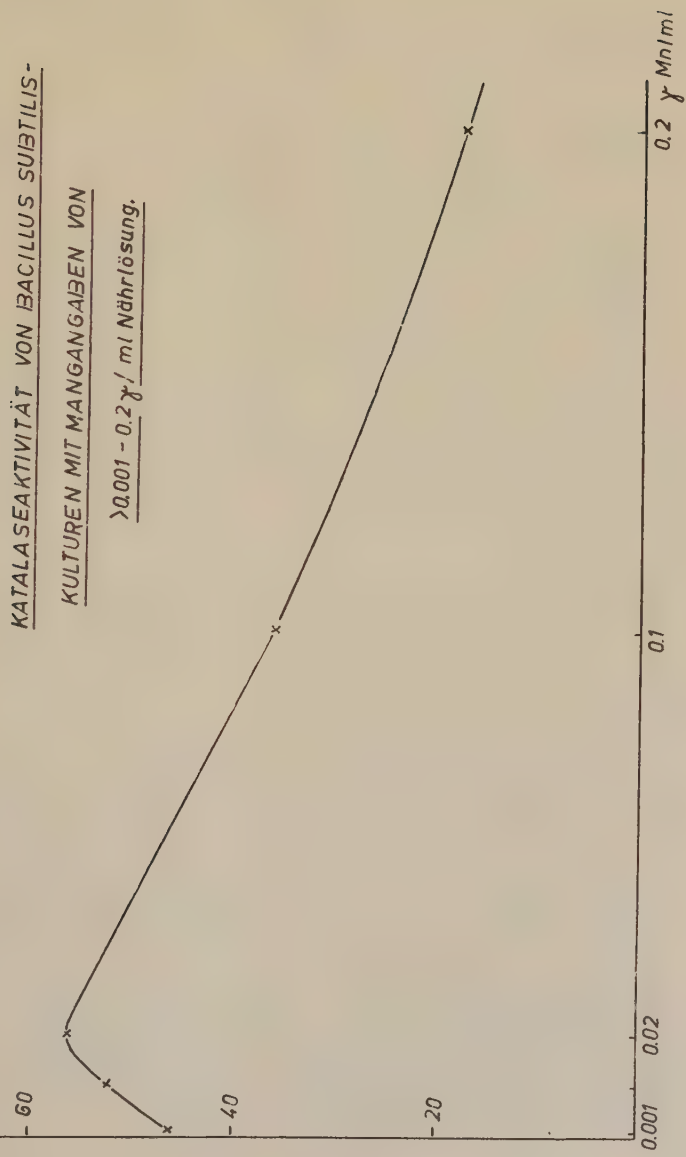
GEABEN.

γ /ml.



ml zersetztes H_2O_2 (1% -lg)

KATALASEAKTIVITÄT VON BACILLUS SUBTILIS-
KULTUREN MIT MANGANGABEN VON
 $>0.001 - 0.2 \text{ } \gamma / \text{ ml Nährlösung.}$



Parallel durchgeführte Blindproben ergaben für alle Mangankonzentrationen gleiche - nur innerhalb der Fehlergrenze der Methode schwankende - Werte.

Das Ergebnis widersprach den Erwartungen : die Aktivität der O-Kontrolle lag in allen Fällen über der mit Mangan versetzter Kulturen. Diese zeigten ab etwa 250 Gamma Mn einen im wesentlichen linearen Abfall der Aktivität bei zunehmender Mangankonzentration. Der relativ große Aktivitätsunterschied zwischen 0 und 10 Gamma Mn ließ die Einbeziehung von Zwischenwerten ($1/2$, 1, 5) in eine neue Serie notwendig erscheinen. Dabei ergab sich, daß Mn-Gaben bis zu einer Konzentration von 1 Gamma Mn / 50 ml (entspricht dem steilsten Abschnitt im Verlauf der Eiweiß-Kurve, vgl. S. 32) zu einer Steigerung, höhere Konzentrationen zu einer Verminderung der Katalaseaktivität im Vergleich zur O-Kontrolle führen.

Diskussion.

Aus den beschriebenen Versuchsergebnissen geht deutlich eine wachstumsfördernde Wirkung von Manganionen hervor, wie sie bereits von CHARNEY et al. (23) sowie LEVINSON und HYATT (27) angedeutet wurde.

Die gefundenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Angaben WEINBERGs (26, vgl. S. 28) und zwar in doppelter Hinsicht: WEINBERG hatte keinerlei Beziehungen zwischen vegetativem Wachstum, Reaktionsverschiebung im Medium und Mangangaben von 10^{-9} bis 10^{-3} mol Mn / 25 ml feststellen können. Eine teilweise Erklärung dieses Widerspruchs dürfte in den von WEINBERG angewendeten, relativ groben Manganbestimmungsmethoden zu suchen sein, deren untere Genauigkeitsgrenze mit 10^{-6} mol Mn angegeben wird, einer Konzentration also, die pro 25 ml Nährlösung nach den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen gerade optimales Wachstum ermöglicht.

Im Zusammenhang mit der wachstumsfördernden Wirkung des Mangans erhebt sich die Frage nach dessen Wirkungsweise. Mangan ist in einer Reihe von Fermenten enthalten.

Eine positive Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit wäre z.B. denkbar im Sinne des von SAZ und SLIE (29) in *Escherichia coli* gefundenen DPN-abhängigen Enzyms, das in Gegenwart von Manganionen organische Nitrogruppen (Chloramphenicol) zu Aminogruppen reduziert, die dabei erforderliche Reduktion von DPN zu DPNH_2 vollzieht sich in Abwesenheit von Mangan in nur sehr geringem Maße.

Ferner stellten STOCKTON and WYSS (30) eine starke Abhängigkeit der Proteinaseproduktion bei *Bacillus subtilis* vom Mn-Gehalt des Mediums fest. Ohne Mn war die Proteinasebildung äußerst niedrig, optimale Mn-Konzentration lag bei 250 Gamma Mn / 50 ml. Zusatz von Mangansalzen am Ende der Wachstumsperiode blieb ohne Wirkung; Mn ist also bereits zur Synthese des Enzyms notwendig (nicht nur Aktivator). Weiterhin berichtet GALE (31), daß bei *Staphylococcus aureus* zur Glutaminsäureassimilation neben Mg auch Mn erforderlich ist.

Schließlich sei noch hingewiesen auf die Rolle von Mn^{++} bei der Fettsäurebildung aus Malonyl-Co-A und Azetaldehyd (aus DECKER (58) nach BRADY, 1951 und WAKIL, 1958).

Es erscheint möglich, daß Manganionen zu einer Erhöhung der Aktivität ähnlicher (und zwar - da Wachstumsstimulation nur bei einem Teil der untersuchten Mikroorganismen zu beobachten war - auf bestimmte Arten beschränkter) Enzymsysteme führen und so eine Intensivierung des gesamten Bau- und Betriebsstoffwechsels bewirken.

Eine Erklärung der anfänglichen Wachstumshemmung durch an sich optimale Mangangaben (nach 4 Tagen 5-fach erhöhte Eiweißmenge im Vergleich zur O-Kontrolle) kann im Vorliegen eines Anpassungsvorganges gesucht werden, mit dem die - durch die Mangangaben bewirkte - Wachstumsdepression der ersten 20 Stunden ausgeglichen und schließlich überholt wird

Die unterschiedlichen Angaben über den wachstumsfördernden Effekt von Manganionen in Flüssigkeitskulturen dürfte zurückzuführen sein auf die erst nach einer bestimmten Zeit auftretende Stimulation der Zellvermehrung. Ihre Nachweisbarkeit ist somit abhängig vom Alter der Kultur sowie der Wachstumsgeschwindigkeit (und damit den Bedingungen des Milieus: Substrat, Temperatur, pH, Sauerstoffversorgung). Da die zitierten Forscher für ihre Untersuchungen verschiedene, rein synthetische Medien verwendeten, finden die ungleichen Befunde ihre Erklärung.

Die schließlich beobachtete Steigerung der Katalaseaktivität steht im Einklang mit den Befunden PATTANAIKs (32), der bei Untersuchungen der Katalaseaktivität von Reispflanzen, die mit verschiedenen Mangankonzentrationen gezüchtet worden waren, deutliche Beziehungen zwischen Fermentaktivität und Mangangehalten gefunden hat (Optimum bei Blattmaterial bei 5 p.p.m.; höhere Gaben verminderten die Aktivität). Er schließt daraus: "it is therefore probable that manganese through the direct influence on the iron containing prosthetic controls the enzyme (catalase) activity". Da es sich bei der enzymatischen Spaltung des Wasserstoffperoxyds um einen grundlegenden stoffwechselphysiologischen Prozeß handelt, der von den niedersten bis zu den höchsten Pflanzen ähnlich verläuft, erscheint ein Vergleich mit den Beobachtungen PATTANAIKs gerechtfertigt.

IV. Verhalten bakterieller Rhizosphärenorganismen von

Avena sativa gegenüber Mangan.

Für die bisherigen Untersuchungen waren Reinkulturen aus den Sammlungen der Bayerischen Landesanstalt für Moorbirtschaft und Landkultur sowie des Botanischen Institutes der Universität München verwendet worden. Um bei der Lösung des Problems der mikrobiologischen Manganfixierung den natürlichen Verhältnissen des Bodens näherzukommen, wurden die Untersuchungen auf direkt aus dem Boden isolierte Stämme ausgedehnt.

Dazu wurde die Rhizosphäre auf Moorboden kultivierter Haferpflanzen untersucht; und zwar auf Grund folgender Erwägungen:

Niedermoorböden enthalten i.d. Regel beträchtliche Mengen Gesamt-mangan, davon ist jedoch häufig nur ein geringer Teil verfügbar (43). Werden diese Böden unter Kultur genommen, so treten besonders bei Anbau von Hafer Wachstums- und Ertragsrückgänge auf (Dörrefleckenkrankheit). Da nun nach HILTNER die Rhizosphäre höherer Pflanzen innerhalb bestimmter Grenzen artspezifisch ist, lag die Vermutung nahe, daß der manganbedürftige Hafer in seinem Wurzelbereich eine besondere "manganophile" Bakterienflora beherbergt. Im folgenden wurde nun der Versuch unternommen die Rhizosphäre auf Moorboden ausgesäter Haferpflanzen quantitativ auf ihr Manganbindevermögen hin zu untersuchen und eventuell darin vorhandene manganfixierende Mikroorganismen artmäßig zu erfassen. Dazu wurden die Wurzeln 10 Wochen alter Haferpflanzen nach gründlichem Abschütteln anhaftender Bodenpartikel unter möglichst sterilen Bedingungen auf Standard-II-Nähragarplatten (mit Bodenextrakt, um die Verhältnisse des natürlichen Milieus möglichst nachzuahmen) ausgelegt und bebrütet. Von den sich entwickelnden Kolonien konnten 21 - z.T. kulturell sowie morphologisch verschiedene - isoliert und nach dem KOCHSchen Plattenverfahren reingezüchtet werden (6 Passagen über Standard-II-Agar, Reinheitsprüfung nach jeder Passage mit Hilfe der Gramfärbung).

Diese in Reinkultur vorliegenden Stämme wurden zunächst in Standard-II-Bouillon ohne sowie mit 20 Gamma Mangan pro ml 4 Tage lang unter Beobachtung des Wachstums und der Fluoreszenz kultiviert und anschließend mit den beschriebenen Methoden auf ihren Gehalt an nicht "aktivem" sowie festgelegtem Mangan geprüft. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

V. Systematische Einordnung der manganfixierenden Stämme aus dem Wurzelbereich des Hafers.

1. Methodik der Bestimmung.

Es wurden nur die 15 Stämme untersucht, die nach 4-tägiger Kultur mehr als 20 Gamma Mangan in nicht extrahierbarer Form gespeichert hatten.

Ihre systematische Einordnung erfolgte nach den in BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (45) sowie den bei MEYN (46) berücksichtigten Merkmalen.

Die zur Bestimmung notwendigen Spezialnährböden wurden hergestellt nach den Angaben bei JANKE (47), SALLE (48), HALLMANN (49) sowie des Manual of pure Culture Study of Bacteria (50) und des Difco Manual (51).

Die Ermittlung der charakteristischen Eigenschaften wurde im einzelnen folgendermaßen durchgeführt:

a) Bestimmung der morphologischen Merkmale.

Die R e i n h e i t der Stämme wurde nach Anfertigung von Grampräparaten in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Beurteilung des Verhaltens bei der G r a m f ä r b u n g erfolgte nach Färbung verschieden alter Bakterien aus verschiedenen Medien (Bouillon, Agar) entsprechend den Vorschriften der mikrobiologischen Kurse des Botanischen Instituts sowie des Instituts für Tierhygiene der Universität München.

Die Grampräparate dienten gleichzeitig zur Ermittlung von G r ö ß e (je drei Längen- und Dickenmessungen der vegetativen Formen bzw. der Sporen) sowie der F o r m der Bakterien. Die Beschreibung der Form erfolgte weiterhin zusammen mit der Prüfung der B e w e g l i c h k e i t durch Beobachtung von Lebendpräparaten ("hängender Tropfen" aus Bouillon- sowie dem Kondenswasser von Schrägagarkulturen).

Das S p o r u l a t i o n s v e r m ö g e n wurde geprüft durch Erhitzen (12 Minuten bei 85° C) 4 Tage alter Suspensionen in sterilem Wasser und anschließender Kultur nach dem Plattenverfahren.

Die Beschreibung der Morphologie der Zellgemeinschaften ergab sich durch Beobachtung des Wachstums in Bouillon und auf Agar.

b) Bestimmung der physiologischen Merkmale.

Die Feststellung der physiologischen Merkmale erfolgte mit Hilfe folgender Untersuchungen:

1. Verhalten gegenüber Kohlehydraten in Standard-II-Bouillon ¹⁾ (F e r m e n t a t i o n).

Der Bouillon (enthält keine Kohlehydrate) wurde jeweils 1% des betreffenden Kohlehydrats sowie Bromthymolbau als Indikator zugesetzt (Umschlagbereich 6.0 - 7.65, bei Säurebildung - Spaltung des KH - Umfärben nach gelb). DURHAM-Röhrchen in der Kulturflüssigkeit sollten Gasbildung anzeigen. Im einzelnen wurden folgende Kohlehydrate zur Prüfung der Fermentation herangezogen:

Monosaccharide	: Arabinose; Glucose.
Disaccharide	: Saccharose, Lactose.
Trisaccharid	: Raffinose.
Polysaccharid	: Stärke (Beschreibung des Nachweises erfolgt getrennt).
Alkohol	: Mannit.
Glucosid	: Aesculin.

Sterilisation erfolgte 15 Minuten lang bei 110° C (darf nicht überschritten werden); anschließend sofortiges Abkühlen in kaltem Wasser. Die Röhrchen wurden vor ihrer Verwendung durch 7-tägiges Bebrüten auf ihre Keimfreiheit geprüft.

In einigen Fällen mußte zur sicheren Diagnose der Abbau einer zweiten Pentose, der Xylose, herangezogen werden, und zwar unter Verwendung eines Ammonsalzes als Stickstoffquelle.

Für den Nachweis der S t ä r k e h y d r o l y s e fand Stärkebouillon (0.2% lösliche Stärke in Bouillon) Verwendung. Die Tüpfelreaktion auf nicht hydrolysierte Stärke wurde in der Zeit von 20 Tagen 5 mal mit LUGOL-scher Lösung vorgenommen.

2. G e l a t i n e v e r f l ü s s i g u n g .

Substrat: Standard-II-Bouillon mit 14% Gelatine. Der Nachweis der Verflüssigung erfolgte auf zweierlei Art:

- a) durch Stichkulturen (bei Zimmertemperatur bebrütet); Beobachtung über 6 Wochen;
- b) durch Beimpfen von Gelatineröhrchen und Bebrütung bei 30° C; nach 3 Tagen Probe auf Verflüssigung durch 1/2 stündiges Erstarrenlassen nicht verflüssigter Gelatine im Kühlschrank ("Schnelltest").

¹⁾ nur in Ausnahmefällen (Diagnose infolge schwachen Wachstums in flüssigem Medium nicht einwandfrei) wurde der KH-Abbau in festem Milieu geprüft.

3. Verhalten gegenüber L a c k m u s m i l c h .

Frische Milch wurde bei 3500 U/min 20 Minuten lang zentrifugiert und entrahmt, anschließend mit 10% konzentrierter Lackmuslösung (MERCK) versetzt, in Röhrchen verteilt, 12 Minuten bei 110° C im Autoklaven sterilisiert und darauf sofort abgekühlt. Prüfung auf Keimfreiheit durch 7-tägiges Bebrüten vor der Verwendung.

4. Bildung von I n d o l .

Als Kulturmedium fand Standard-II-Bouillon, diesmal mit Tryptophanzusatz, Verwendung. Gebildetes Indol sollte mit dem KOVAC-Reagens (MERCK) nachgewiesen werden.

5. N i t r i t b i l d u n g aus Nitrat.

Substrat: Nährbouillon mit 0.1% KNO₃. Zum Nachweis des Nitrits dienten folgende Reagenzien?

- a) eine Lösung von α -Naphthylamin in 5n-Essigsäure (5g / 1)
- b) eine Lösung von Sulfanilsäure in 5n-Essigsäure (8g / 1).

Zum Nachweis von gebildetem Nitrit wurde innerhalb von 20 Tagen fünfmal mit einer Öse je ein Tropfen der Lösungen a und b auf Filterpapier (Schleicher und Schüll, 2043 b) aufgetragen und anschließend ein Tropfen der Kulturflüssigkeit zugesetzt. Ist Nitrit vorhanden, tritt augenblicklich intensive Rotfärbung auf. Dieser "spot test" ermöglicht wiederholte Prüfung derselben Kultur.

6. Bildung von S c h w e f e l w a s s e r s t o f f .

Medium: Nährbouillon mit etwas Cystein. Entstehen der Schwefelwasserstoff läßt sich durch Schwärzung von Bleiazetatpapier nachweisen; die Streifen wurden - ohne die Flüssigkeit zu berühren - in die Röhrchen eingehängt. Nach Beobachtung über 4 Tage gelangten die Kulturen für 30 Minuten in ein Wasserbad von 80° C, wodurch in positiven Fällen eine leichte Intensivierung des Schwärzungsgrades herbeigeführt werden konnte.

Zur sicheren Diagnose einzelner Stämme war die Bestimmung einer Reihe weiterer Eigenschaften erforderlich:

7. Wachstum auf K a r t o f f e l n ä h r b ö d e n .

Für bestimmte Bakterienarten ist Pigmentbildung sowie Wachstumsintensität auf Kartoffelnährböden charakteristisch. Zur Bereitung des Nährbodens wurden aus Kartoffeln mit einem Korkbohrer Zylinder geschnitten, diese diagonal gespalten und die entstandenen Keile in Röhrchen mit dem breiten Ende nach unten auf eine etwa 1 cm hohe, gut durchfeuchtete Watteschicht eingeführt. Sterilisation bei 110° C über 12 Minuten, anschließend Abkühlen und Prüfung auf Sterilität durch 7-tägiges Bebrüten bei 30° C.

8. Wachstum mit Citrat.

Zur Prüfung des Wachstums mit Citrat als alleiniger Kohlenstoffquelle fand das KOSER-Citrat-Medium Verwendung:

Auf 1000 ml:	$\text{Na}(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$	1.5 g
	KH_2PO_4	1.0 g
	MgSO_4	0.2 g
	Na-Citrat	3.0 g.

In positiven Fällen zeigt sich Trübung der Suspension nach 24 bis 48 Stunden Bebrütungszeit.

9. Verflüssigung von LÖFFLERS Blutserum.

Bereitung und Autoklavierung des Nährbodens erfolgte nach Angaben des Difco Manual, wobei besonders darauf geachtet wurde, die Bildung von Blasen in den Schrägschälröhrchen zu verhindern.

10. VOGES - PROSKAUER - Reaktion.

Mit diesem Test, der vor allem bei der Differenzierung der Coli-Aerogenes-Gruppe Verwendung findet, wird die Bildung von Acetylmethylcarbinol aus geeignetem Nährsubstrat (pro 1000 ml: Pepton: 5 g; Glucose: 5 g; K_2HPO_4 : 5 g; dazu bei Sporenbildern 5 g NaCl) durch Zugabe von 10%iger KOH (5 ml) zu einer 24 Stunden alten Kultur (5 ml) durch Hellrotfärbung nachgewiesen. Die Bebrütungstemperatur betrug 30° C, die Suspensionen wurden über 10 Stunden nach Zugabe der Kalilauge beobachtet, meist trat die Färbung jedoch bereits zwischen 2 und 5 Stunden auf.

11. Bildung fluoreszierender Stoffe.

Der Nachweis der Fluoreszenz wurde durch Bestrahlen der Probe mit einer UV-Analysenlampe (NiO-Filter zur Ausschaltung sichtbarer Strahlen) bei gleichzeitigem Vergleich mit einer Blindprobe geführt.

2. Ergebnisse der Bestimmung.

Die isolierten Stämme konnten folgenden Arten zugeordnet werden:

Stamm 1 / 2 / 3

Bacillus subtilis emend. Prazmowski.

Sporen zylindrisch; 1,1 - 1,5; zentral.

Stäbchen, 1,0 x 2,8 μ , einzeln oder in Ketten, gleichmäßig färbbar.

Beweglich.

Grampositiv.

Gelatineverflüssigung: schnell, krater- bis sackförmig.

Agarkolonie: unregelmäßige Form, mit kurzen, wurzelartigen Ausläufern; Oberfläche rauh, matt, flach; grob amorphe Innenstruktur.

Bouillonkultur: nach 24^h schwache Trübung und Kahlhaut. Kahlhaut sinkt ab und wird neu gebildet.

Lackmusmilch: alkalisch, koaguliert, langsam peptonisiert.

Indolbildung: negativ.

Nitratreduktion:

H₂S-Bildung:

Stärkeabbau:

} positiv

Arabinosebouillon: schwache Säurebildung.

Glucosebouillon: Säurebildung.

Lactosebouillon: keine Säurebildung.

Saccharosebouillon: schwache Säurebildung.

Raffinosebouillon:

Mannitbouillon:

Aesculinbouillon:

} keine Säurebildung

VOGES-PROSKAUER: positiv.

Wachstum mit Citrat: schwache Trübung.

Abweichung: keine Säurebildung aus Mannitbouillon.

Stamm 8

B a c i l l u s p u m i l u s Gottheil.

Sporen zylindrisch, dünnwandig, zentral.

Sporangien: zylindrisch, nicht aufgebläht.

Stäbchen, 0.6 x 3.0 μ .

Beweglich.

Grampositiv.

Gelatineverflüssigung: positiv, horizontal.

Agarkolonie: flach, glatt, glänzend, ganzrandig.

Agarstrich: glatt, glänzend, gelblichweiß; kurze Ausläufer.

Bouillonkultur: mit Kahlhaut, ungetrübt, nach 48 Stunden noch ohne Sediment.

Lackmusmilch: langsame Süßgerinnung, Peptonisierung.
Indolbildung: negativ.
Nitratreduktion: negativ.
H₂S-Bildung: positiv.
Stärkehydrolyse: negativ.
Xylosebouillon (Ammoniumsalz als N-Quelle): Säurebildung.
Arabinosebouillon: keine Säurebildung.
Glucosebouillon: Säurebildung.
Lactosebouillon: keine Säurebildung.
Saccharosebouillon: Säurebildung.
Raffinosebouillon: keine Säurebildung.
Mannitbouillon: Säurebildung.
Aesculinbouillon: Säurebildung.
VOGES-PROSKAUER: positiv.
Citrat als alleinige C-Quelle: schwache Trübung.

Stamm 9

Bacillus circulans Jordan

Sporen: ellipsoid; 1.1 - 2.1 μ ; Wand dick, färbbar.
Sporangien geschwollen.
Stäbchen, 0.7 x 4.6 μ , z.T. gebogen, vereinzelt in Ketten.
Beweglich.
Gramvariabel.
Gelatineverflüssigung: positiv (schnell), trichterförmig.
Agarkolonie: unregelmäßige Form, rauh, Rand leicht gelappt, grob amorphe Innenstruktur.
Agarstrich: rauh, gelblichweiß.
Bouillonkultur: nach 48 Stunden schwach getrübt, wenig viscider Niederschlag; pH in Glucosebouillon nach 7 Tagen: 5.4.
Lackmusmilch: sauer, koaguliert, langsam peptonisiert.
Indolbildung: negativ.
Nitratreduktion: negativ.
H₂S-Bildung: negativ
Stärkeabbau: positiv.
Xylosenährlösung (Ammoniumsalz als N-Quelle): Säurebildung.

Xyloseagar: Säurebildung.

Arabinosenährlösung (Ammoniumsalz als N-Quelle): keine Säurebildung.

Arabinoseagar: keine Säurebildung.

Glucosebouillon:

Lactosebouillon:

Saccharosebouillon:

Raffinosebouillon:

Säurebildung

Mannitbouillon: schwache Säurebildung.

Aesculinbouillon: keine Säurebildung.

VOGES-PROSKAUER: negativ.

Citrat als alleinige C-Quelle: kein Wachstum.

Stamm 4

Pseudomonas convexa Chester

Stäbchen, $0.5 \times 1.1 \mu$, einzeln.

Beweglich.

Gramnegativ.

Gelatineverflüssigung: negativ, oberes Drittel des Mediums gelblich verfärbt.

Agarkolonie: rund, glatt, glänzend, konkav, ganzrandig, leicht konzentrisch, fluoreszierend.

Agarstrich: glänzend, bläulichgrün fluoreszierend.

Bouillonkultur: starke Trübung, dicke Kahlhaut, fluoreszierend.

Lackmusmilch: alkalisch.

Wachstum auf Kartoffel: graubraun, glänzend, gutes Wachstum.

Indolbildung:

Nitratreduktion:

H₂-S-Bildung:

Stärkehydrolyse:

negativ

Arabinosebouillon: keine Säurebildung.

Glucosebouillon: schwache Säurebildung.

Saccharosebouillon:

Lactosebouillon:

Raffinosebouillon:

keine Säurebildung

Mannitbouillon:)
Aesculinbouillon:) keine Säurebildung
Kultur bei 37° C:)
in Bouillon: nach 24 Stunden bei gutem Wachstum keine
Fluoreszenz;
auf Schrägagar: wie in Bouillon.

Stamm 6

Pseudomonas convexa Chester var.

Wie Stamm 4, jedoch:
nach 24 Stunden Kultur bei 37° C in Bouillon und auf
Schrägagar starke Fluoreszenz.

Stamm 15

Pseudomonas convexa Chester var.

Wie Stamm 4, jedoch:
in Bouillon nach 24 Stunden bei 30° C nur sehr dünne
Kahmhaut; in Glucosebouillon starke Säurebildung.

Stamm 12

Pseudomonas convexa Chester var.

Wie Stamm 4, jedoch:
in Raffinosebouillon Säurebildung mit anschließender
Rotfärbung des Mediums.

Stamm 7 / 14

Achromobacter delmarvae Smart.

Kurzstäbchen, häufig paarig, 0.7 x 1.1 μ .
Unbeweglich.
Gramnegativ.
Gelatineverflüssigung: negativ.

Agarkolonie: nicht gleichmäßig rund, glatt, glänzend, konvex, ganzrandig, fein amorph.

Agarstrich: gelblichweiß, glänzend, Einzelkolonien schleimig zusammenfließend.

Bouillonkultur: nach 48 Stunden: dichte Trübung, zarter Ring, wenig viscidoides Sediment.

Lackmuskultur: sauer, reduziert, nach 10 Tagen koaguliert, von oben bis zur Mitte rosafarben, allmählich Peptonisation.

Wachstum auf Kartoffel; weißgrau, glatt, glänzend, Medium graubraun verfärbt.

Indolbildung:

Nitratreduktion:

H₂S-Bildung:

Stärkebouillon:

} negativ

Arabinosebouillon: Säurebildung.

Glucosebouillon: Säurebildung.

Saccharosebouillon: keine Säurebildung.

Lactosebouillon: schwache Säurebildung.

Raffinosebouillon:

Mannitbouillon:

Aesculinbouillon:

} keine Säurebildung

Abweichungen: keine Nitratreduktion,

keine Säurebildung aus Mannitbouillon.

Stamm 12 / 13

Achromobacter eurydice

(White) Bergey et al.

Kurzstäbchen, vorwiegend paarig; 0.45 x 0.6 μ .

Unbeweglich.

Gramnegativ.

Gelatineverflüssigung: negativ.

Agarkolonie: rund, ganzrandig, glatt, glänzend, konkav.

Agarstrich: weiß, schleimig.

Bouillonkultur: gleichmäßige Trübung, wenig viscidoides Sediment.

Lackmusmilch: schwach reduziert.

Wachstum auf Kartoffel: grau, schleimig, glänzend.

Indolbildung:	}	negativ
Nitratreduktion:		
H ₂ S-Bildung:		
Stärkeabbau:		
Arabinosebouillon:	}	Säurebildung
Glucosebouillon:		
Lactosebouillon:	}	keine Säurebildung
Saccharosebouillon:		
Raffinosebouillon:		
Aesculinbouillon:		

Stamm 10

Flavobacterium lutescens
(Migula) Bergey et al.

Kurzstäbchen, $0.6 \times 0.9 \mu$, einzeln.

Unbeweglich.

Gramnegativ.

Gelatineverflüssigung: langsam, horizontal, überstehende Flüssigkeit gelb, auf noch unverflüssigter Gelatine gelber Niederschlag.

Agarkolonie: gelblichweiß, rund, glatt, glänzend, ganzrandig.

Agarstrich: nach 24 Stunden: weißlich; runde, glatte, glänzende Einzelkolonien; nach 48 Stunden gelblich, Farbsintensität mit der Zeit zunehmend.

Bouillonkultur: nach 24 Stunden schwache Trübung, nach 8 Tagen von oben nach unten abnehmende gelbe Trübung, viscides Sediment.

Lackmusmilch: nach 8 Tagen alkalisch, koaguliert, allmähliche Peptonisation.

Löfflers Blutserum nicht verflüssigt.

Wachstum auf Kartoffel: goldgelb.

Indolbildung: negativ.

Nitratreduktion: negativ.

H₂S-Bildung: sehr schwach (nach 3 Tagen).

Stärkeabbau: positiv.

Arabinosebouillon:

Glucosebouillon:

Lactosebouillon:

Saccharosebouillon:

Raffinosebouillon:

Mannitbouillon:

Aesculinbouillon:

} keine Säurebildung

Abweichungen: keine Nitratreduktion,

bei Bergey keine Angaben über Stärkeabbau.

Stamm 5

Corynebacterium spec.

Stäbchen, 0.5 x 1.7 μ , am hängenden Tropfen in Gruppen;
winkelige Formen mit metachromatischen Stellen.

Gramvariabel.

Unbeweglich.

Gelatineverflüssigung: langsam, auf verflüssigtem Substrat
schwimmen grünviolette Kahlhautfetzen, Flüssigkeit gelb-
braun, Färbung in den oberen Teil der noch nicht verflüs-
sigten Gelatine übergehend.

Agarkolonien: gelblich, rund, glatt, schwach glänzend,
konvex, ganzrandig, fein amorphe Innenstruktur.

Agarstrich: gelblich, an einzelnen Stellen (Rand) Ausbil-
dung von violetterm Pigment.

Bouillonkultur: nach 48 Stunden noch schwache Trübung ohne
Kahlhaut oder Sediment, nach 8 Tagen starke Trübung,
oberer Teil der Bouillon bläulichgrün verfärbt, violett-
schwarzer Niederschlag.

Lackmusmilch: langsame Süßgerinnung (erst nach 6 Tagen
deutlich), violettschwarzer Ring, unterhalb der koagu-
lierten Zone leichte Reduktion.

Indolbildung:	}	negativ
Nitratreduktion:		
H ₂ S-Bildung:		
Stärkeabbau:		
Arabinosebouillon:		schwache Säurebildung.
Glucosebouillon:		schwache Säurebildung.
Lactosebouillon:	}	keine Säurebildung
Saccharosebouillon:		
Raffinosebouillon:		
Mannitbouillon:		
Aesculinbouillon:		

Zur systematischen Einordnung der isolierten Stämme.

Die systematische Einordnung durch Vergleich der bei den 15 bearbeiteten Stämmen ermittelten Merkmale mit denen der in BERGEY's Manual beschriebenen Formen ließ sich bei 14 Stämmen mit Ausnahme geringfügiger Abweichungen in einzelnen morphologischen und kulturellen Eigenschaften sowie gelegentlich auftretender Verschiedenheiten der physiologischen Leistung (sie wurden der Beschreibung der betreffenden Stämme zugefügt) gut durchführen.

In einem Falle war eine sichere Identifizierung mit beschriebenen Formen nicht möglich. Auf Grund morphologischer und färberischer Merkmale konnte dieser Stamm der Gattung *Corynebacterium* zugeordnet werden. Die Bildung blauschwarzen Pigments spricht für seine Verwandtschaft mit *C. infidiosum*, von dem er jedoch erheblich abweicht in einer Reihe physiologischer Merkmale (keine Säurebildung aus Glucose und Saccharose, keine Stärkehydrolyse).

Bei den vier verschiedenen *Pseudomonas*-formen dürfte es sich trotz der gefundenen Abweichungen lediglich um Varianten der Art *Pseudomonas convexa* handeln, die sich auf Grund der wenig detaillierten Charakterisierung in BERGEY's Manual nicht weiter untergliedern läßt.

Der verhältnismäßig geringe Artenreichtum der untersuchten Proben wird verständlich, wenn man die von vorneherein methodisch bedingten Grenzen der Untersuchungen in Betracht zieht; konnten doch nur die aeroben Formen erfaßt werden, deren Anforderungen an das Substrat außerdem von dem gewählten Medium (Standard-II Nähragar, MERCK, mit Bodenextrakt) erfüllt wurden. So stellen die bestimmten Stämme nur einen Ausschnitt aus der wahrscheinlich reichhaltigeren Mikroflora der Haferwurzelzone dar. Ob es innerhalb dieses Rahmens gelungen ist, ein einigermaßen charakteristisches Bild der Rhizosphäre von *Avena sativa* zu vermitteln, könnte erst durch Vergleich mit weiteren Untersuchungen von Haferpflanzen verschiedener Standorte sowie anderer Gramineenarten ermittelt werden.

C. DISKUSSION.

Betrachtet man die Ergebnisse der Bestimmung zusammen mit den in der Tabelle auf Seite 44 aufgeführten Werten, so fällt die verhältnismäßig hohe Aktivität auch einer Reihe nicht sporenbildender Stämme auf; M a n g a n a u f n a h m e ist somit nicht eine Besonderheit der Sporenbildner, die ihrerseits von Art zu Art beträchtliche Unterschiede des Bindevermögens aufweisen (vgl. *B. Subtilis*, *B. circulans*, *B. pumilus*).

Überraschend hoch erwies sich die Manganaufnahme der geprüften *Pseudomonas*-Stämme, nachdem bei der eingangs untersuchten Art *Pseudomonas fluorescens* keinerlei Mangangfixierung nachweisbar war.

Bei 13 der 15 untersuchten Stämme bewirkten Mangangaben eine Förderung des Wachstums (vgl. S. 44); daraus darf auf einen echten Manganbedarf der betreffenden Arten geschlossen werden. Eine Tatsache, der bei der Übertragung dieser in vitro gewonnenen Ergebnisse auf natürliche Ver-

hältnisse besondere Bedeutung zukommt.

Daß auf Grund der geschilderten Ergebnisse mit einer empfindlichen Beeinflussung des Manganspiegels der Böden durch mikrobielle Aktivität gerechnet werden kann, mögen die folgenden Überlegungen zeigen:

Wie dargestellt wurde, kann für die mittlere Mangankapazität einer Subtilisspore mit einem Wert von mindestens $15 \cdot 10^{-7}$ Gamma gerechnet werden. Bei einer - relativ geringen - Sporendichte von 850 000 Sporen pro Gramm Boden (des untersuchten Materials), an der *Bacillus subtilis* in beträchtlicher Zahl beteiligt sein dürfte (wie sich nachträglich auf Grund der Häufigkeit des Auftretens von *Bacillus subtilis* im Vergleich zu anderen Keimen auf den Wurzelplatten ergab), läßt sich allein für die Sporen von *Bacillus subtilis* eine mögliche Inaktivierung von 750 Gamma Mangan pro kg Boden errechnen. Gleichzeitig muß, wie aus den Bestimmungsergebnissen hervorgeht, mit dem Auftreten einer Reihe weiterer manganfixierender Arten in beträchtlicher Zahl (pro Gramm des untersuchten Bodens waren 1.5 Millionen Keime gezählt worden) gerechnet werden. Somit ist anzunehmen, daß der Gesamtwert für die Manganbindung pro kg Boden wesentlich höher liegt. Abnahme der Keimzahl als Folge ungünstiger Lebensverhältnisse wird im allgemeinen keine Erhöhung des verfügbaren Mangans mit sich bringen, da in der Regel gleichzeitig die Sporulation zunimmt, und die Dauerformen wegen ihres hohen Manganbindevermögens vorübergehend freiwerdendes, vegetativ-bakteriell fixiertes Mangan erneut festlegen. Bei unveränderten Milieubedingungen wird aus absterbenden Bakterienleibern freiwerdendes Mangan wahrscheinlich größtenteils von neu sich bildenden Zellen wieder fixiert, so daß bilanzmäßig kaum ein Gewinn auftritt. Der errechnete Durchschnittswert für die mikrobiologische Manganbindung (etwa 1 mg Mn pro kg Boden) berechtigt zur Annahme, daß in Böden mit

geringen Mengen verfügbaren Mangans ¹⁾ bei Intensivierung des Mikrobenlebens als Folge der üblichen Bodenverbesserungsmaßnahmen (Kalkung, Entwässerung) der Manganspiegel unter den Grenzwert für gesundes Gedeihen höherer Pflanzen absinkt (nach SAMUEL und PIPER (44) für Hafer in Wasserkulturen 1000 - 200 Gamma / Ltr.; für Kartoffeln nach STRUCKMEYER (52) 500 Gamma / Ltr.; COPPENET und COIX (53) betrachten als kritischen Punkt von Böden mit höherem pH als 6 allgemein 1 mg Mangan pro kg Boden). Die sich daraus ergebenden Wachstums- und Ertragsrückgänge können von erheblicher wirtschaftlicher Bedeutung sein.

Zusammenfassend muß somit auf Grund der Ergebnisse dieser Untersuchungen damit gerechnet werden, daß durch die Tätigkeit bestimmter Mikroorganismen die Wirkungen von Mangandüngung erheblich abgeschwächt, und Böden mit geringen Manganreserven zu Manganmangelböden werden.

1) ROTH und PFAFF (43) fanden z.B. in

	mg heißwasserlösl. Mn in 1 Ltr. Boden	pH-Wert
humosem Sand	1.8	6.1
Heidesandboden	0.7	6.1
Niederungsmoor	0.5	6.9

D. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Obwohl seit einiger Zeit bekannt ist, daß Mikroorganismen im Manganhaushalt der Böden eine Rolle spielen, sind bisher quantitative Untersuchungen über die bakterielle Manganfixierung nicht durchgeführt worden. Über die systematische Stellung manganbildender Mikroorganismen liegen nur vereinzelt wenig detaillierte Angaben (vgl. BEIJERINCK S. 2, BROMFIELD S. 7) vor.
2. In dieser Arbeit wurde eine Reihe von definierten Bodenbakterien quantitativ auf ihr Manganbindevermögen in flüssigem Medium geprüft. Dabei ergab sich für *Bacillus subtilis* sowie *Azotobacter chroococcum* bemerkenswerte Manganbindung; die Werte für *Bacillus mycoides* sowie *Pseudomonas fluorescens* und besonders die der 5 untersuchten Streptomycetenstämme waren vergleichsweise niedrig.

Genauere Untersuchung der Manganaufnahme durch *Bacillus subtilis* ergab:

3. Einmal fixiertes Mangan konnte mit Na_2SO_3 , NaHSO_4 und MgSO_4 bzw. Hydrochinon und $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ sowie mit heißem Wasser nie mehr als zur Hälfte reduziert und ausgetauscht bzw. gelöst werden.
4. Zwischen Manganaufnahme und Sporulation bestehen enge Beziehungen. Die Dauerformen weisen ein unverhältnismäßig hohes Manganbindevermögen auf (pro Spore nach unseren Berechnungen etwa 15×10^{-7} Gamma Mn).
5. Mangangaben bewirken Erhöhung der
 - a) Eiweißsynthese,
sie haben deutlichen Einfluß auf
 - b) Farbstoffbildung sowie Reaktionsverschiebung und die
 - c) Katalaseaktivität (fördernd bis zu 1 Gamma / 50 ml)

und führen schließlich in sämtlichen Konzentrationen zu einer

d) Verlängerung der Latenzphase des Wachstums.

6. Aus der Rhizosphäre des Hafers wurden 21 Bakterienstämme isoliert. Davon fixierten 15 mehr als 20 Gamma Mn pro 50 ml Nährlösung. Sie konnten folgenden Gattungen und Arten zugeordnet werden (Reihenfolge nach der Höhe des Manganbindevermögens):

Bacillus subtilis,
Pseudomonas convexa,
Chromobacterium spec.,
Achromobacter delmarvae,
Bacillus pumilus,
Bacillus circulans,
Flavobacterium lutescens,
Achromobacter eurydice.

7. Auf Grund der Intensität der mikrobiologischen Manganbindung werden im Hinblick auf den Mangangehalt bestimmter Böden und den Bedarf von Kulturpflanzen Schlüsse auf die landwirtschaftliche Bedeutung der bakteriellen Manganfestlegung gezogen.

E. LITERATUR.

1. Mc. Hargue, J.S.: The role of manganese in plants. Journ. Am. Chem. Soc. 10 liv. 1592 - 98, (1922).
2. Gilbert, B.E. and Mc. Lean, F.T.: A 'deficiency disease': the lack of available manganese in a lime induced chlorosis. Soil Sci. 26, 27, (1928).
3. Clark, N. and Fly, C.: The role of manganese in the nutrition of Lemna. Plant Physiol. 5, 241, (1930) und 8, 157, (1933).
4. Bukatsch, F.: Über den Einfluß verschiedener mineralischer Ernährung auf den Blattpigmentgehalt und die Photosynthese junger Getreidepflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot. 90, 293 - 334, (1942).
5. Gerretsen, F.C.: Manganese in relation to photosynthesis. Plant and Soil 2, 159 - 193 und 323 - 343, (1950) und 3, 1 - 31, (1951).
6. Samuel, G. und Piper, G.S.: Grey speck (manganese deficiency) disease of oats. Journ. of Agric. 21, 696 - 700 und 789 - 799, (1928).
7. Gerretsen, F.C.: Manganese deficiency of oats and its relation to soil bacteria. Annals of Botany, New Series 1, 207 - 230, (1937).
8. Beijerinck, M.W.: Oxydation des Mangancarbonats durch Bakterien und Schimmelpilze. Folia Microbiologica 2, 213, (1913).

9. Söhngen, N.L.: Umwandlungen von Manganverbindungen unter dem Einfluß mikrobiologischer Prozesse. Zbl. f. Bakt. II, 40, 545 - 555, (1914).
10. Timonin, M.I.: Microflora of the rhizosphere in relation to the manganese deficiency disease of oats. Soil Sci. Soc. Am. Proc. II, 284 - 292, (1946). C.A. 42, 3118.
11. Trocmé, S. und Barbier, G.: Inaktivierung von als Bodendünger dienenden Mangansalzen. Z. f. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 55, 81, (1951).
12. Mann, P.J.G. and Quastel, J.H.: Manganese metabolism in soils. Nature (London) 158, 151, (1946).
13. Dion, H.G. and Mann, P.J.G.: Trivalent manganese in soils. Journ. Agr. Sci. 36, 239 - 245, (1946); Ref. C.A. 2353, (1949).
14. Fujimoto, C.K. and Sherman, C.: Behavior of manganese in the soil and the manganese cycle. Soil Sci. 66, 131 - 145, (1948).
15. Olsen, C.: Über die Manganaufnahme der Pflanzen. Biochem. Zt. 269, (1934).
16. Coix, Y. et Coppenet, M.: Carences en manganèse dans les sols humifères de Bretagne. Soils and Fert. 12, 245, (1949).
17. Lundegardh, H.: Die Nährstoffaufnahme der Pflanze. Fischer, Jena 1932.
18. Newton, B.A.: Reversal of the antibacterial activity of polymyxin by divalent cations. Nature (London) 172, 160, (1953).

19. Albert, A.: Avidity of Terramycin and Aureo-
mycin for metallic cations.
Nature (London) 172, 201, (1953).
20. Bromfield, S.M. Biological oxydation of manganese
and Skerman, W.B.D. in soils. Soil Sci. 69, 337 - 348,
(1950).
21. Stapp, C.: Untersuchungen über die Actino-
myceten des Bodens. Zbl. f. Bakt.
II, 107, 130 - 150, (1953).
23. Charney, J.: Manganese as an essential element
for sporulation of the genus
Bacillus. J. of Bact. 72, 145 - 148,
(1951).
24. Curran, R.H. and The influence of iron or manganese
Evans, F.R.: upon the formation of spores by
mesophilic aerobes in fluid organic
media. J. of Bact. 67, 488 - 497,
(1953)
25. Levinson, H.S. and Manganese and the proteolytic
Sevag, M.G.: activity of spore extracts by Bac.
megatherium in relation to germi-
nation. J. of Bact. 67, 615 - 616,
(1954).
26. Weinberg, E.D.: The effect of Mn^{++} and antimicro-
bial drugs on sporulation of Bac.
subtilis in nutrient broth.
J. of Bact. 70, 289 - 296, (1955).
27. Levinson, H.S. Correlation of respiratory activi-
and Hyatt, M.T.: ty with phases of spore germination
and growth in Bac. megatherium as
influenced by manganese and l-Ala-
nin. J. of Bact. 72, 177 - 183,
(1956).
28. Bersin, T.H.: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie.
4. Aufl., Leipzig 1954.

29. Saz, A.K. and Slie, R.B.: Reversal of Aureomycin inhibition of bacterial cell-free nitro-reductase by manganese. *J. Biol. Chem.* 210, 407 - 412, (1954).
30. Stockton, J.R. and Wyss, O.: Proteinase production by *Bacillus* subt. *J. of Bact.* 52, 227 - 228, (1946).
31. Gale, E.F.: Trace metals in glutamic acid assimilation and their inactivation by 8-Hydroxyquinolin. *J. of Gen. Microbiol.* 3, 369 - 386, (1949).
32. Pattanaik, S.: The effect of manganese on the catalase activity of rice plant. *Plant and Soil* II, 418, (1950).
33. Leuthardt, F.: *Lehrbuch der physiolog. Chemie.* 13. Aufl., Berlin 1957.
34. Stetter, H.: *Enzymatische Analyse.* Weinheim / Bergstraße, 1951.
35. Jander, G., Jahr, K.F.: *Maßanalyse* Göschen 221, Berlin 1952.
36. Koroleff, F.: Determination of manganese in natural waters. *Acta Chemica Scandinavica* 1, 503 - 506, (1947).
37. Thompson, T.G. and Wilson, T.L.: Determination of manganese by oxidation with periodate. *J. Am. Chem. Soc.* 57, 233, (1935).
38. Richards, M.B.: The colorimetric determination of manganese in biological material. *The Analyst* 55, 554 - 560, (1930).
39. Nydahl, F.: Rapid procedures for the determination of manganese in soil extracts and plants. *Annals of the Royal Agric. College of Sweden* 16, (1949).

40. Thun, R., Herrmann, R., Knickmann, E.: Methodenbuch, Bd. 1 : Die Untersuchung von Böden. 3. Aufl. 1955, S. 199.
41. Finck, A.: Aktives und verfügbares Mangan in Podsolen und Braunerden. Landw. Forschg. IX. Bd., H. 3, S. 147 - 154, (1956).
42. Leeper, G.W. und Jones, L.H.P.: Available manganese oxides in neutral and alkaline soils. Plant and Soil 3, 141, (1951).
43. Roth, H. und Pfaff, C.: Über ein Verfahren zur Bestimmung des pflanzenverfügbaren Mangans. 6. Sonderh. zur Zt. Landw. Forschg., 41, (1957).
44. Samuel, G. und Piper, S.: Manganese as an essential element for plant growth. J. agric. Austral. 31, 696, 789, (1928).
45. Bergey : Manual of Determinative Bacteriology. Sixth Edition, Baltimore, (1948).
46. Meyn, A.: Bestimmungsschlüssel für die Gattungszugehörigkeit von Bakterien. Enke, Stuttgart, 1952.
47. Janke, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. 1. Bd. Allgemeine mikrobiologische Methoden. Steinkopff, Dresden und Leipzig, 1946.
48. Salle, A.J.: Laboratory manual of fundamental principles of bacteriology. Third Edition, Mc. Graw Hill, New York, 1948.
49. Hallmann, L.: Bakteriologische Nährböden. Thieme, Stuttgart, 1953.

50. Manual of methods for pure culture study of bacteria. Mc. Graw Hill, London, 1948.
51. Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. Ninth Edition, Difco Laboratories, Detroit 1, 1953.
52. Struckmeyer, B.E. und Berger, K.C.: Plant Physiol. 25, 114, (1950).
53. Coix, Y. et Coppenet, M.: La carence en manganèse dans les terres humifères de Bretagne. C.R. Acad. Agric. 35, 323, (1949); Soils and Fert. 12, 366.
54. Laatsch, W.: Die Umformung des Mangans im Boden in Abhängigkeit von der Witterung. Pontificiae Academiae Scientiarum Scripta Varia 14, 71 - 82, (1956).
55. Winkler, A.: Die Bakterienzelle. Fischer, Stuttgart, 1956.
56. Friedrich, J.: Getreide-, Hackfrucht- und Futterbau auf süddeutschen Hoch- und Übergangsmooren bei Anwendung von Spurenelementen. Bay. Landw. Jhb. Sonderh. 5, (1956).
57. Scharrer, K.: Biochemie der Spurenelemente. Parey, Berlin, 1955.
58. Decker, K.: Aktivierter Essigsäure. Enke, Stuttgart, 1959, S. 238.

S c h l u s s w o r t

Vorliegende Arbeit wurde an der Bayerischen Landesanstalt für Landkultur und Moorwirtschaft sowie dem Botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

Den Direktoren der beiden Anstalten, Herrn Professor Dr. L. B r a u n e r und Herrn Regierungsdirektor Dr. J. F r i e d r i c h danke ich für das der Arbeit entgegengebrachte Interesse.

Für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit bin ich Herrn Dr. H. P o s c h e n r i e d e r sowie Herrn Dr. F. B u k a t s c h zu Dank verbunden.

Herrn Oberregierungsrat H i l p o l t s t e i n e r sei für die Anregungen bei der Arbeit gedankt.

Lebenslauf.

Am 1. August 1934 wurde ich als Sohn des Landwirts Alfred Bauer n f e i n d in Röslau in Oberfranken geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Röslau trat ich 1946 in die Oberrealschule Wunsiedel ein und unterzog mich dort im Juni 1953 mit Erfolg der Reifeprüfung. Im Wintersemester 1957 / 58 begann ich unter Leitung meines sehr verehrten Lehrers, Herrn Professor Dr. F. B u k a t s c h , mit dem experimentellen Teil der Arbeit, deren Fertigstellung im Herbst 1959 erfolgte.

